

Le rôle des microARNs dans la mise en place de la maladie chez les plantes

par

Salma El Mnouchi

thèse présentée au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, juillet 2015

Le 16 juillet 2015

*le jury a accepté la thèse de Madame Salma El Mnouchi
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Kamal Bouarab

Directeur de recherche

Département de biologie

Docteur Armand Séguin

Évaluateur externe

Centre de foresterie des Laurentides

Service canadien des forêts

Professeur Vincent Burrus

Évaluateur interne

Département de biologie

Professeur François Malouin

Président-rapporteur

Département de biologie

SOMMAIRE

La réussite de la mise en place d'une résistance efficace chez la plante hôte requiert la présence d'un dialogue entre les différentes voies signalétiques menant à l'induction de la défense. L'implication de l'extinction génique post-transcriptionnelle dans la résistance contre des agents pathogènes, autres que les virus, est une nouvelle avenue qui va permettre de disséquer le lien qui peut exister entre les deux voies immunitaires de la plante : celle qui est déjà importante pour lutter contre les bactéries et les champignons (voie induite à la suite de la reconnaissance des éliciteurs) et celle de l'extinction génique post-transcriptionnelle. Les résultats que nous avons obtenus ont une signification très importante concernant l'implication de l'extinction génique post-transcriptionnelle dans la résistance des plantes contre les agents pathogènes d'une manière générale et *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicicola* et *Pseudomonas syringae* en particulier. Mon travail de recherche a permis d'identifier le miR472 comme étant un acteur qui favorise la mise en place de la maladie causée par des agents pathogènes du type nécrotrophe et hémibiotrophe. De plus j'ai pu, en utilisant le modèle *P. syringae* pv tomato DC3000-*Arabidopsis*, disséquer dans le détail, comment la bactérie manipule la machinerie de la plante pour activer la voie des microARNs menant à l'accumulation du miR472, responsable de la suppression de la résistance basale et du PTI. Cette suppression passe par l'inhibition de sa cible, la protéine NB-LRR; *RDS1* un nouveau régulateur impliqué dans le PTI induit par la Flg22.

Cette étude permettra une avancée remarquable dans les connaissances reliées à l'immunité des plantes, ce qui constituerait une étape clé dans la découverte de nouvelles stratégies de lutte contre les agents phytopathogènes. Sur le plan fondamental, cette étude a permis de consolider le dialogue qui existe entre les voies immunes de la plante et de mettre en évidence un nouvel acteur impliqué dans la résistance basale. En matière d'application, comprendre les mécanismes de défense et de résistance des plantes aux agents pathogènes est primordial pour développer des plantes génétiquement résistantes et des stimulateurs de défense naturelle

(Vaccin de plantes). Ceci constitue un enjeu majeur dans l'objectif de concevoir de nouveaux moyens de lutte phytosanitaire, à la fois plus respectueux de l'environnement et ayant moins d'impact sur la santé humaine.

Arabidopsis thaliana, *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicicola*, *Pseudomonas syringae*, microARN, CC-NB-LRR.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire du Professeur Kamal Bouarab à l'Université de Sherbrooke. Mes sincères remerciements s'adressent, à mon directeur de recherche, Dr. Kamal Bouarab, dont la rigueur et les critiques ont été d'un apport inestimable durant ma formation. Sa passion pour la recherche, son dévouement au travail et ses qualités de pédagogue chevronné resteront pour moi un modèle. J'ai toujours apprécié ses compétences professionnelles reconnues par tous ceux qui ont eu la chance de travailler avec lui. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance. Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance au Professeur François Malouin pour ses conseils avisés, sa disponibilité et pour avoir accepté d'être le président rapporteur de ma thèse. Je tiens aussi à remercier le Professeur Vincent Burrus, pour ses conseils précieux et ses critiques constructives. J'adresse mes profonds remerciements au Docteur Armand Séguin pour avoir accepté d'être l'examineur de ce manuscrit. J'adresse ma profonde gratitude à Taha Abd El Rahman et Fatma khalfaoui pour leur participation à la réalisation de ce projet. J'aimerais aussi remercier Nicolas Bologna et Olivier Voinnet (ETH, Zurich, Suisse) pour leur collaboration. Un grand merci aux membres du laboratoire, ceux toujours présents et ceux qui sont partis, Rocio Gonzalez-Lamothe, Raphael Sansregret et Mohamed El Oirdi. Mes remerciements s'adressent aux organismes subventionnaires pour leur soutien financier durant mes études doctorales à savoir le CRSNG et le FRQNT, et ainsi qu'à la Mission Universitaire de Tunisie à Montréal.

Ce manuscrit est un hommage à la mémoire de mon défunt père pour tous les sacrifices qu'il a consentis pour ma réussite, pour sa bienveillance et son amour inconditionnel. Que son âme repose en paix. À ma mère, à qui je dois tout, pour m'avoir soutenue dans ce que je voulais faire et m'avoir motivé quand je n'allais pas bien. Que tu trouves dans ce travail le fruit de tes sacrifices. À mes amours Sahbi et Rayan mes deux rayons de soleil, sans lesquels ma vie n'aurait aucun sens.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES FIGURES.....	xv
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION.....	1
I.1. Les mécanismes de défense chez les plantes.....	2
I.1.1. Notions de base de l'interaction hôte-agent pathogène.....	2
I.1.2. Défenses constitutives.....	4
I.1.3. Défenses induites.....	6
I.1.3.1. La résistance basale ou PTL.....	6
I.1.3.2. La réponse de défense gène-pour-gène ou ETL.....	11
I.1.3.3. Modèle évolutif en zigzag de l'interaction hôte-agent pathogène.....	15
I.1.4. Hormones végétales impliquées dans la défense.....	17
I.1.4.1. Acide salicylique.....	17
I.1.4.2. Acide jasmonique.....	18

I.1.4.3. Éthylène.....	21
I.1.4.4. Interaction entre les messagers secondaires.....	21
I.1.5. Mise en place des réponses de défense.....	22
I.1.5.1. Les phytoalexines.....	22
I.1.5.2. Les protéines PR.....	23
I.1.5.3. Réaction hypersensible.....	25
I.1.6. Résistance systémique.....	26
I.2. L'ARN d'interférence.....	27
I.2.1. Méthylation de l'ADN.....	28
I.2.2. La voie antivirale.....	29
I.2.3. La voie des microARNs.....	30
I.2.3.1. Découverte des microARNs.....	30
I.2.3.2. Caractéristiques générales des microARNs.....	31
I.2.3.3. Biosynthèse des microARNs.....	33
I.2.3.4. Mode d'action et régulation génique.....	35
I.2.3.4.1. Régulation génique transcriptionnelle.....	36
I.2.3.4.2. Régulation génique post-transcriptionnelle.....	38
I.2.3.5. Importance des microARNs dans la régulation génique chez les plantes.....	39
I.2.3.6. Dialogue.....	42

I.3. Agents pathogènes.....	43
I.3.1. Agents pathogènes nécrotrophes.....	44
I.3.2. Agent pathogène hémibiotrophe.....	49
I.4. Objectifs du projet de recherche.....	60
CHAPITRE 2.....	63
LES NÉCROTROPHES MANIPULENT LA VOIE DE MIR472-RDR6 EN CIBLANT UN CC-NB-LRR POUR INSTAURER LA MALADIE.....	63
2.1. Matériel et méthodes.....	63
2.1.1. Modèle végétal et conditions de croissance.....	63
2.1.2. Extraction d'ADN et géotypage.....	63
2.1.3. Conditions de croissance des champignons et tests d'infection.....	64
2.1.4. RT-PCR quantitative et semi-quantitative.....	65
2.1.5. Détection par hybridation sur puce des microARNs.....	67
2.1.6. Cartographie du site de clivage de l'ARNm cible.....	68
2.1.7. Analyses statistiques.....	68
2.2. Résultats.....	68
2.2.1. Dicer-Like 1 et Argonaute 1 d' <i>Arabidopsis</i> promeuvent la maladie causée par les agents pathogènes nécrotrophes.....	68
2.2.2. miR472 favorise la maladie causée par les agents pathogènes nécrotrophes.....	73
2.2.3. RDR6 favorise la maladie causée par les nécrotrophes en supprimant la voie de l'AJ.....	78

2.2.4. Le gène CC–NB–LRR : RDS1 ciblé par la voie de l’extinction à l’ARN qui passe par miR472-RDR6, contribue à la résistance contre les nécrotrophes	80
2.3. Discussion.....	85
CHAPITRE 3.....	90
<i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> MANIPULE LE MIR472 POUR PERMETTRE LE DÉVELOPPEMENT DE LA MALADIE.....	90
3.1. Matériel et méthodes.....	90
3.1.1. Modèle végétal.....	90
3.1.2. Conditions de croissance des souches bactériennes et tests d’infection	90
3.1.3. Expériences de réponses à la Flg22 et à la coronatine.....	91
3.1.4. Analyses statistiques.....	92
3.2. Résultats.....	93
3.2.1. <i>Pst</i> DC3000 induit l’accumulation du miR472.....	93
3.2.2. miR472 contribue à la maladie causée par <i>Pst</i> DC3000 chez <i>A. thaliana</i> ...	94
3.2.3. <i>RDS1</i> réduit la susceptibilité d’ <i>A. thaliana</i> à <i>Pst</i> DC3000.....	97
3.2.4. La coronatine est responsable de l’accumulation du miR472 chez <i>A. thaliana</i> en réponse à l’infection par <i>Pst</i> DC3000.....	100
3.2.5. <i>Pst</i> DC3000 utilise la coronatine pour inhiber l’expression de <i>RDS1</i>	104
3.2.6. Le miR472 contribue à la susceptibilité médiée par la coronatine.....	106
3.2.7. L’inhibition de l’immunité basale par La COR nécessite en partie le miR472.....	108
3.2.8. Étude du promoteur du miR472.....	110

3.2.9. La coronatine induit l'accumulation de MYC2.....	112
3.2.10. <i>MYC2</i> contribue à l'inhibition de l'immunité basale médiée par la COR...	113
3.2.11. <i>MYC2</i> régule positivement l'accumulation du miR472.....	114
3.3. Discussion.....	117
CONCLUSION.....	122
ANNEXES.....	127
BIBLIOGRAPHIE.....	134

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN:	acide désoxyribonucléique «DNA»
ADNc:	ADN complémentaire
AJ:	acide jasmonique
AGO:	protéine Argonaute
ARC:	APAF-1 (Apoptotic protease activating factor 1), protéine R et Ced3/4
ARN:	acide ribonucléique «RNA»
ARNdb:	ARN double brin «dsRNA : double-stranded RNA»
ARNi:	interférence à l'ARN «RNAi : RNA interference»
ARNm:	ARN messenger «mRNA : messenger RNA»
ARNnc:	ARN non codant «ncRNA : non coding RNA»
ARNsb:	ARN simple brin «ssRNA : single-stranded RNA»
AS:	acide salicylique
miARN:	micro ARN «microRNA»
sARN:	petit ARN «small RNA»
siARN:	petit ARN d'interférence «small interfering RNA»
ATP:	adénosine triphosphate
Avr:	avirulence, pour un gène ou une protéine «gène Avr ou protéine Avr»
BED:	domaine de liaison à l'ADN

°C:	degré Celcius
Ca⁺⁺:	ion calcium
CC:	domaine de dimérisation en torsade d'hélices «coiled coil domain»
Cl⁻:	ion chlorure
COI1:	protéine d'insensibilité à la coronatine «coronatine insensitive 1»
COR:	coronatine
Dicer:	ribonucléase de la famille des ARNase III
DCL:	ARNase de type III homologue à Dicer «Dicer-like»
dNTP:	désoxyribonucléotides 5'-triphosphate
EDS1:	sensibilité à la maladie accrue « Enhanced Disease Susceptibility»
EF:	«elongation factor»
ERF:	facteur de transcription sensible à l'éthylène
Et:	éthylène
ET3:	facteurs de virulence de type 3
ETI:	«Effector Triggered Immunity»
ETS:	«Effector Triggered Susceptibility»
Flg22:	peptide de la flagelline
FLS2:	«Flagellin Sensitive 2»
FRK1:	«Flagellin-Induced Receptor Kinase 1»

H⁺:	ion hydrogène
H₂O₂:	peroxyde d'hydrogène
HC-Pro:	composé auxiliaire de protéinase
HIP1:	protéine d'interaction avec HcPro 1 «HcPro interacting protein 1»
HrpZ:	«harpin elicitor»
ISR:	résistance systémique induite
JAZ:	«Jasmonate ZIM domain protein»
JIN1:	facteur de transcription insensible au jasmonate «jasmonate insensitive 1»
K⁺:	ion potassium
LRR:	séquence répétée riche en leucine «leucine rich repeat»
LRR-RLK:	«Leucine-Rich Repeat-Receptor-like Kinases»
LRR-RLP:	«Leucine-Rich Repeat-Receptor like Proteins»
MAPK:	protein MAP kinase «Mitogen Activated Protein Kinase»
MAMP:	motif moléculaire associé au microorganisme «microbe-associated molecular pattern»
MCP:	mort cellulaire programmée
miR:	gène codant pour un microARN
MTI:	Immunité induite par les MAMPs
MYC:	facteur de transcription induit par l'AJ

NB:	domaine de liaison à un nucléotide «nucleotide binding domain»
NO:	oxyde nitrique
NPR1:	protéine non-expresser de protéine PR «non-expressor of PR genes»
nt:	nucléotide
O²⁻:	anion superoxide
OH:	radical hydroxyl
PAMP:	motif moléculaire associé à l'agent pathogène «pathogen-associated molecular pattern»
PCR:	réaction en chaîne par la polymérase «polymerase chain reaction»
PEP:	«Plant Elicitors Peptides»
PEPR:	«PEP Receptors»
PR:	relié à l'agent pathogène «pathogen-related»
PRR:	récepteur de reconnaissance des motifs «pattern recognition receptor»
PTI:	Immunité induite par les PAMPs
PTGS:	«Post Transcriptionnal Gene Silencing»
R:	résistance, pour un gène ou une protéine «gène R ou protéine R»
RH:	réaction hypersensible «HR : hypersensitive reaction»
RISC:	«RNA-induced silencing complexe»
RDR:	ARN polymérase dépendante de l'ARN «RNA-dependant RNA polymerase»

RDS1:	réducteur de la susceptibilité à la maladie 1«Reduced Disease Susceptibility1»
RLK:	protéine kinase homologue à un récepteur «receptor-like kinase»
ROS:	espèce activée d'oxygène «Reactive Oxygen Species»
RT-PCR:	réaction de transcription inverse suivie d'une PCR «reverse transcriptase PCR»
SCF:	complexe protéique SKP1/CDC53p/CUL1 boîte F
SAR:	résistance systémique acquise
SCF:	SKP1/CDC53p/CUL1 boîte F
SD:	«Solanceaous Domain»
TGA:	classe de facteurs de transcription
TGS:	«Transcriptionnal Gene Silencing»
TIR:	domaine homologue au récepteur Toll de Drosophila et au récepteur de l'interleukine-1 chez l'humain «Toll and interleukin-1 receptor»
TIR1:	protéine d'inhibition du transport 1 «transport inhibitor response 1»
TTSS:	système de sécrétion de type III «type III secretion system»
UV:	ultraviolet
VIGS:	«Virus induced gene silencing»
WRKY:	facteur de transcription de plante

LISTE DES TABLEAUX

1.	Définition des notions de base de l'interaction hôte-agent pathogène.....	3
2.	Défenses structurales de la plante et caractéristiques.....	4
3.	Quelques exemples de facteurs de virulence de <i>P. syringae</i> DC3000 et leurs cibles.....	15
4.	Les familles de protéines reliées aux agents pathogènes (PR).....	25
5.	Quelques exemples de phénotypes résultants de mutants surexprimant des miARNs ou possédant des cibles résistantes à un miARN.....	41
6.	Pathovars, hôtes et symptômes liés aux infections à <i>P. syringae</i>	51
7.	Antibiotiques nécessaires à la croissance des différentes souches de <i>P. syringae</i> ...	91

LISTE DES FIGURES

1.	Reconnaissance d'un PAMP par un PRR au niveau de la membrane cellulaire et activation des cascades de signalisation menant à la réponse immune.....	8
2.	Mise en place du PTI.....	9
3.	Mécanisme d'action des éliciteurs PEP suite à l'exposition à des PAMPs.....	11
4.	Injection des facteurs de virulence de l'agent pathogène et inhibition de la réponse immune.....	12
5.	Reconnaissance des NB-LRR par leurs effecteurs spécifiques, levée de l'inhibition des cascades de signalisation et restauration de la résistance.....	14
6.	Modèle Zigzag représentant le développement de la résistance ou la sensibilité dépendante de [PTI - ETS + ETI].....	16
7.	Biosynthèse de l'acide jasmonique à partir de l'acide linoléique dans la plante.....	20
8.	Représentation schématique des réponses immunes systémiques.....	27
9.	Schéma de la biogenèse d'un miARN à partir d'un gène <i>MIR</i>	35
10.	Alignement et mise en évidence du site de clivage au niveau du transcrit du gène At3g26810 par le miR393a.....	36
11.	Modèle d'interférence transcriptionnel par miARN intégré dans un complexe RITS.....	37
12.	Régulation négative temporelle des protéines AP2-like par le miR172 responsable de la floraison chez <i>A. thaliana</i>	38
13.	Présentation schématique du blocage traductionnel induit par le miR172a/c au niveau de l'ARNm cible codant la protéine SCL6.....	39

14.	Différence phénotypique entre la plante sauvage (wt) et le mutant miR159ab.	40
15.	Germination et développement de l'appressorium d'une spore de <i>B. cinerea</i>	44
16.	<i>B. cinerea</i> au microscope électronique.....	45
17.	Cycle de vie de <i>B. cinerea</i>	47
18.	A : Taches foliaires causées par <i>A. brassicicola</i> sur une feuille de chou d'abyssinie (<i>Crambe abyssinica</i>); B : conidies d' <i>A. brassicicola</i> disposées en chaîne.....	48
19.	Développement et symptômes causés par <i>Alternaria</i>	49
20.	<i>P. syringae</i> au microscope électronique.....	50
21.	Symptômes de différents pathovars de <i>P.syringae</i> sur différents cultivars.....	52
22.	Schématisation du passage de <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> de la phyllosphère vers l'apoplaste foliaire.....	54
23.	PAI hrc/hrp de <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000.....	55
24.	Schéma du TTSS.....	56
25.	Structure de la coronatine.....	57
26.	Effet de la coronatine sur les stomates.....	58
27.	Similarité structurale entre la Coronatine et l'acide jasmonique conjugué à l'isoleucine.....	59
28.	DCL1 contribue à la maladie causée par les agents pathogènes nécrotrophes <i>B. cinerea</i> et <i>A. brassicicola</i> chez <i>A. thaliana</i>	70
29.	AGO1 favorise la maladie causée par <i>B. cinerea</i> et <i>A. brassicicola</i> chez <i>A. thaliana</i>	72

30.	<i>B. cinerea</i> induit l'accumulation du miR472 chez <i>A. thaliana</i>	74
31.	miR472 contribue à la maladie causée par <i>B. cinerea</i> et <i>A. brassicicola</i> chez <i>A. thaliana</i> en supprimant les défenses dépendantes de la voie de l'AJ.....	77
32.	RDR6 favorise la maladie causée par <i>B. cinerea</i> et <i>A. brassicicola</i> chez <i>A. thaliana</i> en supprimant les défenses dépendantes de la voie de l'AJ.....	79
33.	Une cible prédite du miR472 réduit la susceptibilité d' <i>A. thaliana</i> à <i>B. cinerea</i> et <i>A. brassicicola</i>	82
34.	La CC-NB-LRR RDS1 est une cible directe de la voie d'interférence médiée par miR472-RDR6.....	84
35.	Accumulation du miR472 en réponse à l'infection par <i>Pst</i> DC3000.....	94
36.	miR472 affecte la résistance basale activée par <i>Pst</i> DC3000 chez <i>A. thaliana</i>	96
37.	<i>RDS1</i> contribue à la résistance basale induite par <i>Pst</i> DC3000 chez <i>A. thaliana</i>	99
38.	Accumulation du miR472 en réponse à la coronatine.....	103
39.	La coronatine régule négativement l'accumulation de <i>RDS1</i>	105
40.	Croissance de <i>Pst</i> DC3000 et de <i>Pst</i> DC3118 infectant des plantes Col-0 et <i>mir472</i>	107
41.	Le miR472 contribue à la suppression du PTI médiée par la COR.....	109
42.	Séquence du promoteur d'ath-MIR472 (3kb).....	111
43.	La coronatine induit l'accumulation du MYC2.....	112
44.	La coronatine affecte le PTI induit par la Flg22 via le MYC2.....	114
45.	<i>MYC2</i> régule positivement l'accumulation du miR472 et permet l'inhibition de l'expression de <i>RDS1</i> ainsi que de <i>PR5</i>	116

46.	Modèle intégratif des résultats et des perspectives.....	126
-----	--	-----

INTRODUCTION

Les plantes cultivées, sont exposées à des agresseurs présents dans leur environnement, tels que les bactéries, les virus, les viroïdes, les nématodes, les insectes et même d'autres plantes parasites (Dreher et Callis, 2007). Pour se protéger, elles sont équipées d'un arsenal de mécanismes de défense. Suite à une infection, dépendamment de l'agresseur, les plantes vont déclencher un remaniement rapide de l'expression des gènes afin de moduler certaines voies métaboliques et d'induire des réponses de défense appropriées (Phillips *et al.*, 2007). Cependant, lorsque les mécanismes de résistance des plantes sont inefficaces contre un agent pathogène, celui-ci réussit à infecter son hôte ce qui mène au développement de la maladie. Les maladies engendrées par les agents pathogènes constituent un lourd fardeau pour l'agriculture et l'industrie agroalimentaire. Ainsi près de 20 à 40% des récoltes sont perdues à la suite du développement d'agents microbiens (selon l'Organisation Mondiale de la Santé). La méthode privilégiée pour lutter contre ces agents ravageurs est l'épandage des pesticides de synthèse. Ces produits chimiques sont considérés comme l'arme la plus efficace pour faire face à ces problèmes. À l'échelle mondiale, environ 600 pesticides sont utilisés couramment, mais plus de 1600 composés ont été commercialisés à un moment ou à un autre (Lebailly *et al.*, 2007). Ces substances ont des conséquences néfastes sur l'environnement à cause de l'accumulation de résidus de pesticides, la pollution des sols et le déséquilibre écologique. En effet, plusieurs de ces composés de synthèse ont un large spectre d'action, détruisant non seulement les agents nuisibles, mais également les autres populations de l'écosystème (Thakore, 2006). En outre, de nombreux problèmes de santé humaine seraient liés aux pesticides. Diverses études révèlent une très forte augmentation de certains cancers (prostate et pancréas) chez les personnes en contact chronique avec des pesticides (Clary, 2003; Settini, 2003; Bassil *et al.*, 2007). De plus certains pesticides deviennent de moins en moins efficaces dans le traitement des infections causées par des agents pathogènes chez les plantes dû à l'apparition des mécanismes de résistance chez ces derniers.

L'utilisation de variétés améliorées, dont entre autres les organismes génétiquement modifiés (OGM) n'a pas donné satisfaction contre les organismes pathogènes. De nombreux travaux sont entrepris pour trouver de nouveaux moyens de protection des cultures, tout en respectant la santé humaine et l'environnement.

I.1. Les mécanismes de défense chez les plantes

Au jeu de l'évolution, il semble que les cartes n'ont pas été distribuées équitablement. En effet, dépourvues de nerfs et de muscles, les plantes paraissent démunies devant leurs multiples agresseurs. Incapables de se mouvoir, toutefois elles regorgent de ressources et n'ont rien à envier aux animaux. D'ailleurs, le développement d'une maladie chez une plante constitue l'exception à la règle. En effet, la plupart du temps, les plantes arrivent à contrer l'invasion des agents pathogènes grâce à leurs mécanismes de défense. En réponse aux attaques de ces envahisseurs, les plantes ont développé des stratégies de défense présentes à plusieurs niveaux (physiques, chimiques, génétiques) et faisant appel à une multitude d'effecteurs activant plusieurs mécanismes afin de limiter ou d'empêcher la prolifération de l'envahisseur.

I.1.1. Notions de base de l'interaction hôte-agent pathogène

Il est primordial, avant d'entamer les différents mécanismes de défense de la plante, de passer en revue les notions de l'interaction qui a lieu entre une plante et un agent pathogène. Avant la mise en place de la relation parasitaire, le dialogue moléculaire qui s'établit entre le parasite et la plante aboutit à deux situations. Soit il y a compatibilité entre l'agent pathogène et son hôte, dans ce cas, il y a apparition de la maladie. Soit il y a incompatibilité, dans ce cas, aucun symptôme ni modification du métabolisme n'est retrouvé sur la plante. Cette incompatibilité

peut être expliquée à plusieurs niveaux. Le tableau 1 résume quelques définitions nécessaires à la compréhension du lien étroit qui existe entre un agent phytopathogène et son hôte ainsi que l'infection qui en résulte.

Tableau 1. Définition des notions de base de l'interaction hôte-agent pathogène (D'après Guest et. Brown, 1997; Hammond-Kosack et Jones., 1996).

Relation	Description
Compatibilité	
	<ul style="list-style-type: none"> - Les défenses mises en place par la plante ne sont pas spécifiques contre le germe donné. - Les défenses mises en place ne sont pas efficaces.
Incompatible	
Non hôte	- La plante est insensible à la présence de l'agent pathogène. Tous les génotypes d'une espèce donnée sont résistants à toutes les souches d'un agent pathogène donné.
La plante est antagoniste de l'agent pathogène	- Le cultivar sécrète des substances qui inhibent la croissance d'un pathovar donné.
L'agent pathogène est antagoniste de la plante	- Le pathovar sécrète des toxines spécifiques d'un cultivar donné. Quand le cultivar ne correspond pas, la plante est dite résistante.

Antagonisme mutuel	- Résulte en une mort cellulaire des deux parties : hôte et agent pathogène.
Barrière phénologique	- Cycles de développement entre hôte et parasite non concordant : impossibilité d'infection.

I.1.2. Défenses constitutives

Les défenses préformées constituent une composante majeure de la résistance non hôte. Cette défense préformée ne requiert, en effet, aucun stimulus préalable. Elle est présente et active avant même qu'une infection ait lieu. Cette défense peut être aussi bien structurale que chimique. Le tableau 2 en présente quelques exemples.

Tableau 2. Défenses structurales de la plante et caractéristiques (D'après Walton, 1994; Guest et Brown., 1997; Freeman et Beattie, 2008).

Barrières	Caractéristiques
Cuticule et Cire	<p>L'épaisseur de la cuticule est un facteur déterminant pour empêcher la pénétration de l'agent pathogène. Étant hydrophobe, elle empêche aussi l'accumulation d'eau sur la surface des feuilles les rendant hostiles à la prolifération d'agents pathogènes ayant besoin d'humidité pour se développer.</p> <p>La présence de cires empêche la fixation de l'agent pathogène.</p> <p>La cire peut contenir des substances toxiques ou des métabolites secondaires.</p>

Paroi cellulaire	<p>Elle a une double structure (paroi primaire et secondaire)</p> <p>Elle contient des composés chimiques préformés à déploiement facile</p> <p>Pectine : ciment des cellules</p> <p>Lignine : elle durcit les tissus et leur confère la rigidité, l'imperméabilité et gêne ainsi leur digestion.</p> <p>Possibilité d'induction de la callose en cas d'attaque.</p>
Stomates et Lenticelles	<p>La plante contrôle la taille, la localisation, la forme, le nombre ainsi que l'ouverture des stomates, pour empêcher le passage des agents pathogènes dans l'apoplaste.</p> <p>Les lenticelles s'emplissent de suber qui encombre l'espace et exclut ainsi l'agent pathogène.</p>

En plus des barrières physiques, la plante possède un attirail chimique constamment présent pour faire face aux attaques potentielles. Les métabolites secondaires y jouent un rôle primordial. On peut citer :

- Les terpénoïdes : c'est la plus grande classe de métabolites secondaires de plantes. En particulier les diterpénoïdes présentent un grand potentiel antimicrobien et antifongique.
- Les Phytoanticipines : dont la plus impliquée est la saponine. Ce sont des triterpénoïdes liés à un groupement sucre. Elles sont hautement efficaces pour détruire la membrane cellulaire des champignons en se liant aux stérols présents sur celle-ci.
- Composés phénolés : les plus importants sont les isoflavonoïdes qui dégradent la paroi cellulaire des bactéries.

En plus des métabolites secondaires, la plante possède des effecteurs du type protéique intervenant dans l'immunité passive. On cite :

- Les défensines : ce sont des peptides antimicrobiens riches en cystéines. Elles inhibent la croissance bactérienne et leur action est assimilable aux protéinases.
- Lysozymes : enzymes hydrolytiques qui dégradent la paroi bactérienne
- Chitinases : enzymes catalysant la dégradation d'un composé essentiel de la paroi cellulaire des champignons appelé chitine.

I.1.3. Défenses induites

Lorsque ces barrières constitutives ne produisent pas l'effet dissuasif escompté, les défenses induites prennent la relève afin de contrer l'invasion par les agents pathogènes grâce à la mise en place de diverses réponses de défense. Les phytoalexines et les protéines reliées à l'agent pathogène (PR) sont des composés antimicrobiens synthétisés *de novo* qui figurent parmi les molécules déployées lors de la mise en place de la défense induite.

I.1.3.1. La résistance basale ou PTI

L'immunité basale ou PTI ou MTI (pour PAMPs ou MAMPs Triggered Immunity, PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) et MAMP (Microbial Associated Molecular Patterns)) est la première résistance active mise en place par la plante «sensible» suite à son exposition à un agent pathogène « virulent » (Jones et Dangl, 2006). Ces motifs moléculaires sont présents chez plusieurs agents pathogènes (Boiler et Felix, 2009; Boiler et He, 2009).

L'activation de cette réponse immunitaire innée se manifeste comme suit :

- Lors des premiers contacts plante-agent pathogène, il y a une reconnaissance des motifs conservés PAMP bactériens, également désignés éliciteurs généraux, par des récepteurs transmembranaires au niveau des cellules végétales appelés PRRs (pour pattern recognition receptor).
- En plus des lipopolysaccharides et des peptidoglycanes, les hairpins (HrpZ) de *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Samuel *et al.*, 2005), le peptide Pep 13 de la transglutaminase chez *Phytophthora sojae* (Fellbrich *et al.*, 2002), les élicitines présentes chez certains oomycètes ainsi que les xylanes et les chitines fongiques (Voegelé *et al.*, 2009) constituent des exemples de PAMPs.
- Le plus commun des PAMPs étudiés est certainement la Flagelline de *Pseudomonas syringae*, composé du flagelle bactérien (Asai *et al.*, 2002), elle est nécessaire à sa mobilité ainsi qu'à sa pathogénicité dans la mesure où elle est reconnue comme PAMP. Sa reconnaissance par le récepteur FLS2 (Flagellin Sensitive 2) induit des réponses immunitaires au niveau cellulaire (Gomez-Gomez et Boller, 2002; Zipfel et Felix, 2005).
- La Flg22, peptide synthétique conçu à partir d'un des domaines les plus conservés et actifs de la flagelline est capable à lui seul tout aussi bien que la flagelline en entier d'induire le même type de réponse (Felix *et al.*, 1999). La figure 1 montre la liaison qui a lieu entre un PAMP et un PRR et ses effets sur la cellule.

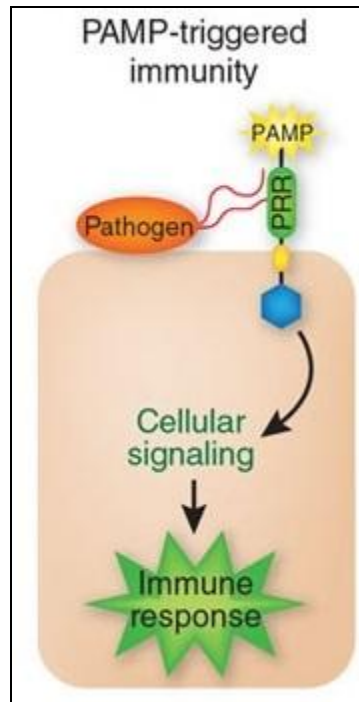


Figure 1. Reconnaissance d'un PAMP par un PRR au niveau de la membrane cellulaire et activation des cascades de signalisation menant à la réponse immune (Pieterse *et al.*, 2009).

Dès qu'il y a reconnaissance grâce aux récepteurs PRRs, il y a induction d'une cascade de signalisation faisant intervenir des MAPKinases (Mitogen Activated Proteins) (Mishra *et al.*, 2006). Les MAPKs vont moduler l'expression de facteurs de transcription tels que les WRKY (Eulgem et Somssich, 2007) et permettre ainsi d'amorcer l'expression de gènes impliqués dans la mise en place de la résistance (Gohre et Robatzek, 2008). Les plus importants gènes marqueurs du PTI sont *FRK1* (Flagellin-Induced Receptor Kinase 1) et les gènes *PR* (Pathogenesis-Related). L'expression de ces gènes va orchestrer différents événements post-reconnaissance (Yamaguchi et Hufferker, 2011). En un premier lieu, une alcalinisation du milieu de croissance de l'agent pathogène *via* des flux d'ions H^+ , K^+ , Cl^- et Ca^{++} représente une première réponse physiologique pour perturber son développement. Ensuite, il y a production de ROS (Reactive Oxygen Species), dépôt de callose ainsi que libération de composés antimicrobiens (Nurnberger *et al.*, 2004) et parfois fermeture des stomates

(Pitzschke *et al.*, 2009; Faulkner et Robatzek, 2012) pour bloquer l'intrusion de l'agent pathogène. En plus des gènes exprimés et des protéines mises en jeu, la défense basale implique une régulation hormonale de la cellule. L'acide salicylique (AS), induit en réponse aux agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes va inhiber la voie de signalisation qui passe par l'acide jasmonique (AJ) et l'éthylène (Et) induits en réponse aux agents pathogènes nécrotrophes. De plus, il y a répression de l'auxine (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). La figure 2 résume schématiquement les événements cellulaires qui ont lieu suite à la reconnaissance d'un PAMP par un PRR et la mise en place du PTI.

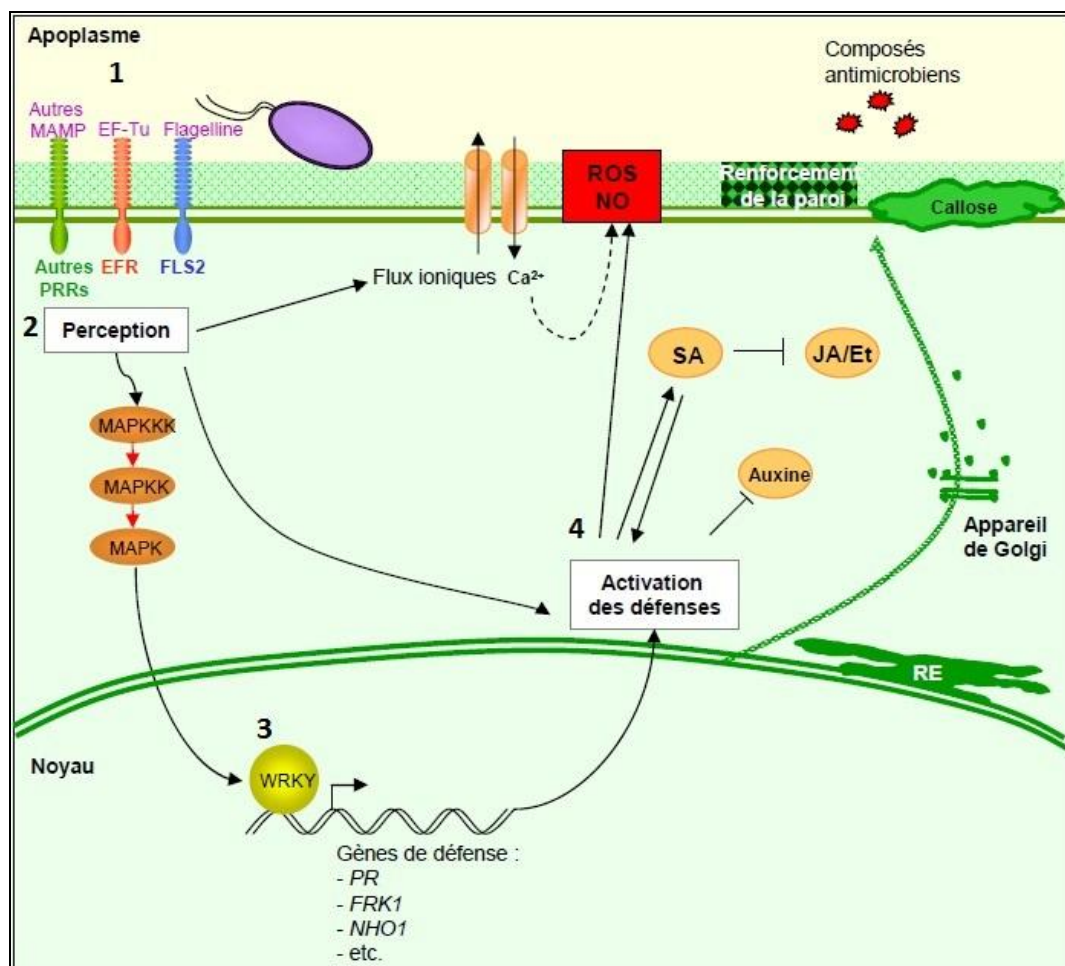


Figure 2. Mise en place du PTI.

(1) L'agent pathogène est reconnu *via* l'interaction de son PAMP avec le PRR de la cellule. (2) La perception déclenche une cascade de signalisation par les MAPKs et un flux de Ca^{++} qui engendre la

libération de ROS et d'azote. (3) Les MAPKs amorcent des facteurs de transcription qui activent l'expression des gènes de défense. (4) L'activation des défenses s'exprime par une régulation des hormones de la plante comme l'acide salicylique (AS), jasmonique (AJ), l'éthylène (Et) et l'auxine. Il s'ensuit l'induction de la callose au niveau de la membrane (Poueymiro, 2009).

Cependant, les bactéries virulentes sont la plupart du temps capables de contourner le PTI et d'inhiber les réponses de défense de la plante. Ce qui implique le passage à un second niveau de défense amorcé par les gènes de résistance de la plante en réponse à des facteurs de virulence spécifiques de l'agent pathogène.

- Les éliciteurs du PTI :

Lors du PTI, une amplification du signal a lieu, celle-ci est assurée par des petits peptides présents dans l'apoplaste appelés éliciteurs PEP (pour Plant Elicitors Peptides). Leur expression est induite par l'exposition de la cellule à des PAMPs. Ils contribuent à amplifier le PTI dans les cellules exposées ainsi que celles avoisinantes. Ils agissent de manière autocrine en se liant à leurs récepteurs PEPR (pour PEP Receptors) (Yamaguchi et Huffaker, 2011). La figure 3 schématise le mécanisme d'action des PEP.

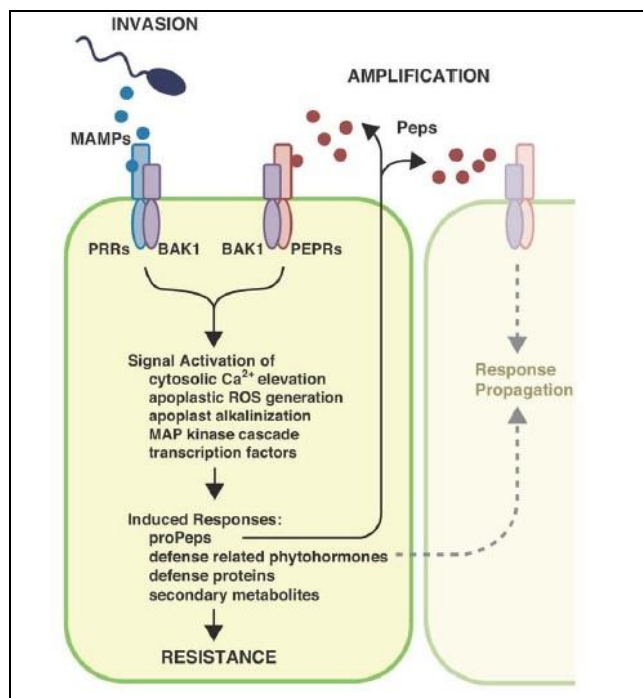


Figure 3. Mécanisme d'action des éliciteurs PEP suite à l'exposition à des PAMPs (Yamaguchi et Huffaker, 2011).

I.1.3.2. Réponse de défense gène pour gène ou ETI

Cette réponse de défense se base sur la reconnaissance des effecteurs de l'agent pathogène ou ETI «Effector Triggered Immunity». Le PTI implique une reconnaissance de l'agent pathogène à l'extérieur de la cellule hôte résistante alors que la réponse gène-pour-gène implique l'importation de molécules pathogéniques à l'intérieur de celle-ci. Ces molécules sont appelées facteurs de virulence ou effecteurs et induisent une certaine susceptibilité qualifiée d'ETS «Effector Triggered Susceptibility». La figure 4 illustre la mise en place de l'ETS après injection des facteurs de virulence.

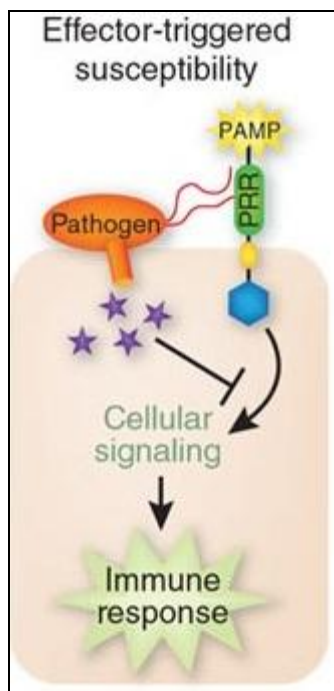


Figure 4. Injection des facteurs de virulence de l'agent pathogène et inhibition de la réponse immune (Chisholm *et al.*, 2006).

À ce jour, le modèle de sécrétion le mieux caractérisé est celui des bactéries Gram négatif telles que *P. syringae*. Celles-ci ont acquis la capacité de sécréter leurs facteurs de virulence *via* leur système de sécrétion de type III (TTSS). Ce système permet d'injecter ces facteurs de virulence de type 3 (ET3) à l'intérieur de la cellule d'*Arabidopsis thaliana*. Ces ET3 sont capables d'altérer le PTI (Cunnac *et al.*, 2009). En effet, ils possèdent pour un bon nombre d'entre eux une activité enzymatique qui leur permet de dégrader ou modifier les protéines effectrices du PTI. Ils agissent en bloquant la production de ROS (Hann et Rathjen, 2007), ou en inhibant l'expression des gènes de défense (Li *et al.*, 2005). Certains effecteurs imitent l'effet de certaines phytohormones. C'est le cas de *P. syringae* qui sécrète la coronatine, une phytotoxine analogue à l'acide jasmonique. En plus d'interférer avec la voie de signalisation de l'acide jasmonique, la coronatine induit l'ouverture des stomates, ce qui permet la pénétration de la bactérie dans l'apoplaste (Memelink, 2009). D'autre part, il existe des

facteurs de virulence qui interfèrent avec la voie de l'interférence à l'ARN, tel que le cas du composé auxiliaire de protéinase (HC-Pro), qui est une protéine virale qui supprime cette voie chez la plante hôte (Shiboleth *et al.*, 2007). Les effecteurs agissent donc à différents niveaux selon le type de protéines de virulence secrétées. *P. syringae* peut sécréter jusqu'à 30 différents facteurs de virulence (Chang *et al.*, 2005). Chez les agents pathogènes fongiques, comme *Botrytis cinerea*, c'est l'haustoria qui assure la diffusion des effecteurs favorisant ainsi la virulence.

Les effecteurs sont reconnus par des protéines codées par les gènes de résistance spécifiques appelés gènes «R» (Résistance). Ils codent pour des phytoprotéines intracellulaires. On distingue plusieurs classes de protéines R, dont la plus grande classe regroupe celles ayant trois domaines distincts, parmi lesquels deux sont hautement conservés: le domaine NB (Nucleotide Binding site) et le domaine LRR (Leucine Rich Repeat). À ces deux domaines, s'ajoute en N-terminal un domaine TIR ayant une forte homologie avec le domaine de signalisation intracellulaire *Drosophila* Toll et le récepteur interleukine de mammifère (IL)-1 ou le domaine CC (Coiled-Coil). De plus, le domaine CC peut être couplé à un domaine additionnel SD (Solanceous Domain) ou un domaine BED de liaison à l'ADN (Moffett, 2009). Des travaux ont montré que les domaines en N-terminal du domaine NB pourraient, de concert avec celui-ci, jouer un rôle important dans la spécificité de reconnaissance de l'agent pathogène. Les domaines en N-terminal sont impliqués dans les interactions avec les partenaires en aval de la voie de signalisation induite (Belkadir *et al.*, 2004). Le domaine NB est lié à un domaine analogue à celui des protéines animales pro-apoptotiques. Ce domaine intercalé entre le domaine NB et le domaine LRR, se nomme le domaine ARC pour APAF-1 (Apoptotic protease activating factor 1), protéine R et Ced3/4 (Dangl et Jones, 2001; Belkadir *et al.*, 2004). Il y a deux types de domaine ARC : ARC 1 et ARC 2. Les domaines NB et ARC sont requis pour l'hydrolyse de l'ATP et la signalisation mise en place (Nimchuk *et al.*, 2003). De plus, les domaines ARC contribuent prioritairement à la liaison nucléotidique et potentiellement à leur hydrolyse (Takken *et al.*, 2006; Takken et Tameling, 2009). Ces types de protéines R se retrouvent dans le cytoplasme des plantes hôtes et confèrent la résistance aux

bactéries, agents pathogènes fongiques, nématodes, oomycètes, insectes et virus (Moffett, 2009). Les autres classes de protéines R sont constituées de Leucine-Rich Repeat-Receptor like Proteins (LRR-RLP) et elles ont un domaine LRR extracellulaire lié à un domaine transmembranaire. Les Leucine-Rich Repeat-Receptor-like Kinases (LRR-RLK) ont un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine kinase intracellulaire (Moffett, 2009). *EDSI* (sensibilité à la maladie accrue «Enhanced Disease Susceptibility») code pour une protéine homologue aux lipases et qui est nécessaire pour la résistance médiée par les protéines R présentant le domaine TIR (Falk *et al.*, 1999; Peart *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005). Chaque NB-LRR reconnaît spécifiquement, un facteur de virulence précis. On parle dans ce cas de « résistance gène pour gène » (Flor, 1971). Quand une protéine R se fixe à son facteur de virulence correspondant, il y a activation des voies de signalisation de l'ETI (pour Effector Triggered Immunity) (Jones et Dangl, 2006). La figure 5 représente la reconnaissance NB-LRR/Effecteur et la résistance mise en place.

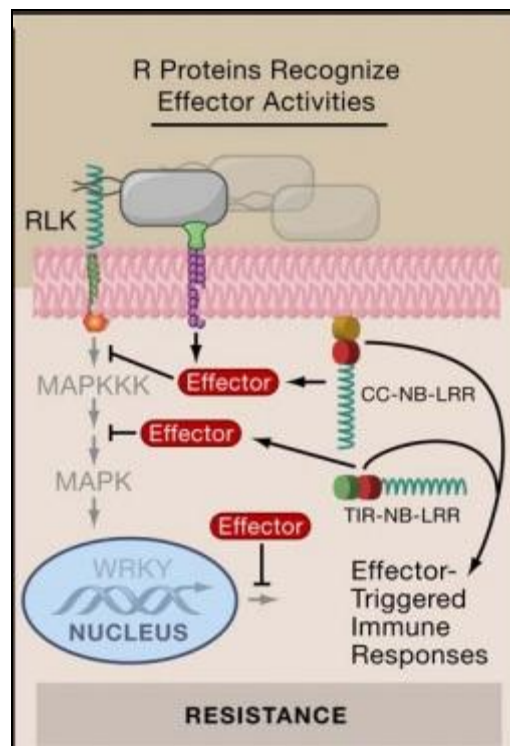


Figure 5. Reconnaissance des effecteurs par leurs NB-LRR spécifiques, levée de l'inhibition des cascades de signalisation et restauration de la résistance (Chisholm *et al.*, 2006).

Une fois reconnu par une protéine R, l'effecteur devient avirulent, d'où la notation «Avr». Suite à cette reconnaissance, la bactérie perd son pouvoir pathogène. L'ETI engendre souvent une réaction hypersensible (RH) localisée au site d'infection (Greenberg et Yao, 2004). Le tableau 3 récapitule quelques effecteurs de *P. syringae* DC3000 et leurs cibles dans les cellules d'*A. thaliana*.

Tableau 3. Quelques exemples de facteurs de virulence de *P. syringae* DC3000 et leurs cibles.

Facteur de virulence	Cible	Activité	Référence
AvrPtoB	Fen	E3 ubiquitine ligase	Abramovitch <i>et al.</i> , 2006
HopAI1	MAPK3/MAPK6	Phosphothréonine lyase	Li <i>et al.</i> , 2007
HopAO1	Non identifiée	Tyrosine phosphatase	Espinosa <i>et al.</i> , 2003
HopU1	GRP7	Mono-ADP-ribosyltransférase	Fu <i>et al.</i> , 2007

I.1.3.3. Modèle évolutif en zigzag de l'interaction hôte-pathogène

Le dialogue moléculaire entre la plante et l'agent pathogène peut se résumer en quatre phases (figure 6) :

Phase 1 : la reconnaissance des PAMPs par les récepteurs transmembranaires (PRR) induit un premier type de réaction immunitaire PTI (PAMP triggered immunity).

Phase 2 : les agents pathogènes produisent des effecteurs capables de supprimer ou de contourner l'immunité basale PTI pour mener à l'ETS (Effector Triggered Susceptibility) établissant ainsi une relation de virulence entraînant la susceptibilité de la plante à l'agent pathogène.

Phase 3 : les plantes ont développé une deuxième série de défense nommée ETI (Effector Triggered Immunity) pour détecter les effecteurs.

Phase 4 : l'agent pathogène modifie ou élimine le gène Avr, de sorte que le produit du gène R ne reconnaisse plus le produit du gène Avr qui lui est spécifique. La plante est à nouveau susceptible à l'agent pathogène et il en résulte l'établissement de la maladie. Éventuellement, le cycle reprend, lorsqu'un nouveau gène R est produit pour reconnaître un nouvel effecteur entraînant ainsi une deuxième ETI (Tiré de Jones et Dangl, 2006).

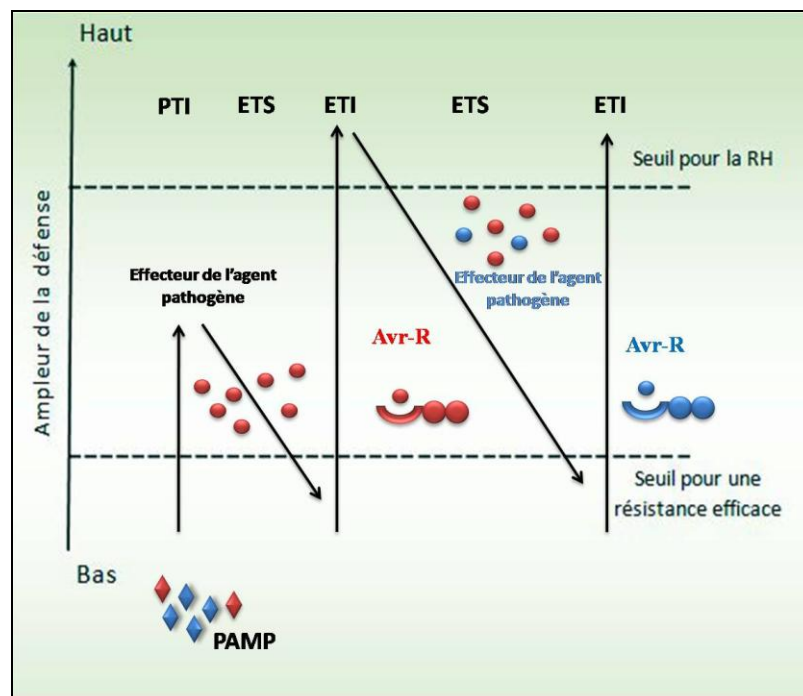


Figure 6. Modèle Zigzag représentant le développement de la résistance ou la sensibilité dépendante de [PTI - ETS + ETI].

I.1.4. Hormones végétales impliquées dans la défense

Les messagers secondaires créent un pont entre la transduction des signaux induits par la reconnaissance des éliciteurs et la modulation de l'expression des gènes liés à la défense par les facteurs de transcription. Outre les molécules mentionnées précédemment, les ROSs et le NO, d'autres messagers secondaires sont produits lors des interactions plante-agent pathogène. La nature des messagers secondaires présents et leur niveau de production dépendent de l'agent pathogène impliqué. Généralement, un agent pathogène biotrophe, ayant besoin de cellules vivantes pour proliférer, induira la mise en place des réponses de défense médiées par l'acide salicylique (AS). Un agent pathogène nécrotrophe, qui tire profit des cellules mortes, induira la mise en place des réponses de défense liées à l'acide jasmonique (AJ) et à l'éthylène (El Oirdi et Bouarab, 2007). Quoiqu'il en soit, il semble y avoir un dialogue finement régulé entre ces messagers secondaires pour mener à bien la résistance, peu importe que l'agent pathogène soit biotrophe ou nécrotrophe. En fait, l'AS, l'AJ et l'éthylène vont agir en synergie ou s'antagoniser selon la concentration à laquelle ils sont présents (Huckelhoven, 2007; Mur *et al.*, 2006).

I.1.4.1. Acide salicylique

L'AS est une hormone végétale qui régule la croissance végétale. Il peut être synthétisé à partir de la phénylalanine, mais certaines évidences suggèrent qu'il serait principalement produit à partir d'isochorismate (Glazebrook, 2005). La signalisation médiée par l'AS est induite en réponse aux agents pathogènes biotrophes. Une des voies de signalisation médiée par l'AS dépend de la protéine NPR1 (non-expresser de gènes PR), qui agit en aval de l'AS. Lorsque la concentration d'AS est faible, NPR1 se trouve sous forme d'oligomères dans le cytosol. Lorsqu'un stress biotique induit l'accumulation d'AS, les ponts disulfures retenant les protéines sont réduits, et NPR1 se retrouve sous forme monomérique (Glazebrook, 2005). La forme monomérique de NPR1 migre au noyau, où elle interagit avec des facteurs de

transcription de la classe des TGA pour activer l'expression de protéines liées à la défense, notamment la protéine PR1 (Glazebrook *et al.*, 2003). Au moins une autre voie de signalisation est médiée par l'AS, mais celle-ci est indépendante de la protéine NPR1. L'ordre des événements de transduction activés par l'AS est difficile à élucider, car ils comprennent plusieurs boucles de rétrocontrôle. Par exemple, l'AS interagit avec l'H₂O₂, le NO et médie la RH, mais la RH stimule également l'accumulation d'AS. Cette hormone est également responsable de la résistance systémique acquise (SAR), qui confère une résistance d'une durée variable aux cellules végétales de toute la plante et les protège en cas de réinfection (Kiraly *et al.*, 2007).

I.1.4.2. Acide jasmonique

L'AJ et ses dérivés sont des produits de la voie des octadécanoïdes. Outre son rôle de défense contre les agents pathogènes nécrotrophes, cette phytohormone participe aussi à la régulation du développement. En effet, c'est un régulateur négatif de la croissance racinaire. Les précurseurs de l'AJ sont l'acide linoléique (C18:3) et l'acide hexadécatriénoïque (C16:3) (Mur *et al.*, 2006). La signalisation médiée par l'AJ est induite en réponse à des blessures et à des agents pathogènes nécrotrophes. L'accumulation d'AJ et de méthyl jasmonate permet la transcription de gènes qui codent pour des protéines de défense telles que les défensines et les thionines, deux classes de peptides anti-microbiens actifs contre une vaste gamme d'agents pathogènes (Adermann, 2006; Chan *et al.*, 2005). L'AJ et le méthyl jasmonate régulent aussi des gènes modulant leur propre synthèse (Glazebrook *et al.*, 2003). L'AJ est aussi impliqué dans le stress oxydatif. L'AJ interagit avec la protéine d'insensibilité à la coronatine (COI1). COI1 est une protéine E3 ubiquitine ligase contenant un motif de boîte F en N-terminal et un domaine LRR en C-terminal. La protéine COI1 fait partie d'un complexe protéique SCF (SKP1/CDC53p/CUL1 boîte F). La COI1 permet l'ubiquitination spécifique de certaines protéines, qui sont ensuite dirigées par SCF^{COI1} afin d'être dégradées par le protéasome 26S (Devoto et Turner, 2003). Il a été montré que le complexe SCF^{COI1} médie la dégradation de

répresseurs de gènes liés à la défense comme la protéine JAZ (Jasmonate ZIM domain protein). Une fois le répresseur dégradé, les facteurs de transcription induits par l'AJ, comme le MYC2, peuvent se lier aux régions promotrices afin de permettre la transcription des gènes de défense (Chico *et al.*, 2008). Parmi ces facteurs, on compte le facteur de transcription sensible à l'éthylène (ERF) et l'AP2/ERF sensible à l'octadécanoïde 59 (ORA59) (Memelink, 2009).

La biosynthèse de l'acide jasmonique

Les jasmonates sont des phyto-oxylipines synthétisées à partir d'acides gras insaturés *via* le patron des lipoxygénases (LOX). Cette voie de synthèse de l'AJ est unique de part le fait qu'elle implique l'oxygénation enzymatique des acides gras. La première enzyme de cette voie de biosynthèse est une phospholipase catalysant l'hydrolyse des acides gras insaturés. Ces derniers sont des octadécanoïdes abondants dans la membrane des chloroplastes, site où les étapes initiales de la biosynthèse de l'AJ ont lieu (La Camera *et al.*, 2004; Delker *et al.*, 2006; Liechti et Farmer, 2006). En effet, ces étapes se résument, principalement, en une série de réactions de désaturation des lipides. Les enzymes responsables de ces réactions sont dénommées : les désaturases d'acides gras (FADs) (Wallis et Browse, 2002). FAD 2 convertit l'acide oléique (18 :1) en acide linoléique (18 :2) qui est pris en charge par FAD3 pour générer l'acide linoléique (18 :3) (Wallis et Browse, 2002). L'acide linoléique est le substrât de la 13-lipoxygénase (13-LOX) qui génère l'acide (13 S)-hydroperoxy-octadécatriénoïque (13-HPOT). Ce dernier est par la suite converti en allène oxyde (acide 12, 13-epoxyoctadécatriénoïque) par l'allène oxyde synthase (AOS). L'AOS porte un peptide signal de localisation au chloroplaste et elle est présumée comme étant l'enzyme limitante de la biosynthèse de l'AJ (Delker *et al.*, 2006; Schaller et Stintzi, 2009). Chez *Arabidopsis*, il n'y a qu'un seul gène codant pour l'AOS (Park *et al.*, 2002; Delker *et al.*, 2006). La biosynthèse de l'AJ est régulée par différents mécanismes dont la disponibilité du substrat pour chacune des enzymes de la voie de biosynthèse. De plus, il a été démontré que malgré l'abondance d'AJ,

l'activation de la biosynthèse ne se fait que suite à la perception d'un stimulus externe (Wasternack, 2007). Ainsi la variation de la concentration de l'AJ serait un facteur plus important que sa quantité totale absolue. Plus précisément, cette variation active la plupart des enzymes de la voie de biosynthèse de l'AJ en plus de l'expression des gènes qui sont dépendants de cette hormone (Weber, 2002; Browse, 2009). L'AJ peut être converti en plusieurs composés différents. Deux de ces composés se sont révélés comme ayant une importance prépondérante lors de la réponse de défense : le méthyle-jasmonate (MeJA) et l'acide jasmonique-isoleucine (AJ-Ile) (Weber, 2002; Farmer, 2007). La figure 7 résume les principales étapes de biosynthèse de l'acide jasmonique.

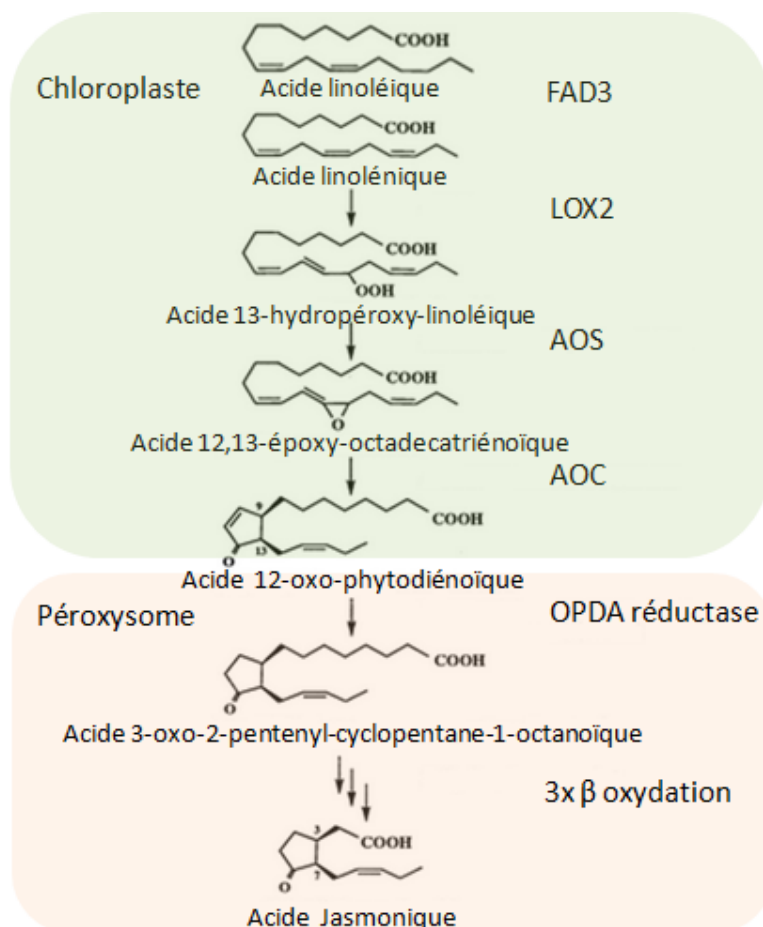


Figure 7. Biosynthèse de l'acide jasmonique à partir de l'acide linoléique dans la plante.

(FAD3 : désaturase d'acide gras 3; LOX2 : lipoxygénase 2; AOS : allène oxyde synthase; AOC : allène oxyde cyclase). (Adapté de Stintzi et Browse, 2000)

I.1.4.3. Éthylène

L'éthylène est une petite hormone diffusible synthétisée à partir de la méthionine. Cette hormone est impliquée dans la régulation de nombreux phénomènes physiologiques de la plante, dont le développement, la sénescence des feuilles et des fleurs ainsi que dans les interactions plante-agent pathogène. La production d'éthylène est induite autant par des facteurs de stress abiotiques que biotiques. Au niveau des interactions plante-agent pathogène, l'éthylène agit de concert avec l'AJ, du moins dans certaines voies (Glazebrook, 2005). Elle mène à l'expression de gènes liés à la mise en place des barrières physiques, à la production d'enzymes nécessaires à la synthèse de métabolites secondaires antimicrobiens ainsi que de protéines PR (Broekaert *et al.*, 2006; Huckelhoven, 2007).

I.1.4.4. Interaction entre les messagers secondaires

Les subtilités de la régulation et du dialogue entre l'AS, l'AJ et l'éthylène ne sont pas élucidées. À titre d'exemple, l'éthylène et l'AJ agissent généralement de concert, mais certains événements de transduction ne requièrent qu'un seul des deux protagonistes. À concentration élevée, l'AS et l'AJ s'antagonisent (Devoto and Turner, 2003; Mur *et al.*, 2006). Parmi les effecteurs de la voie de l'AS qui antagonisent la voie de l'AJ, on rapporte la protéine NPR1. La NPR1 inhiberait le complexe SCF^{COI1}, ce qui empêche la dégradation des répresseurs des gènes induits par l'AJ. À l'inverse, une forte concentration d'AJ mènerait à la dégradation de NPR1 (Devoto et Turner, 2003). D'autres points de contrôle seraient impliqués dans ces effets antagonistes, mais les mécanismes et les autres molécules en jeu ne sont pas connus

(Glazebrook, 2005). Néanmoins d'autres évidences suggèrent que l'AS et l'AJ sont tous les deux requis pour certaines réponses de défense. La répression médiée par ces voies l'une envers l'autre serait donc dose dépendante (Mur *et al.*, 2006; van Wees *et al.*, 2000).

I.1.5. Mise en place des réponses de défense

Différents mécanismes de défense sont mis en place par les plantes pour contrer l'invasion, le développement et la prolifération des agents pathogènes. Les armes utilisées par les différents agents pathogènes sont très diversifiées. Conséquemment, chaque interaction plante-agent pathogène met en place des réponses de défense distinctes, afin d'assurer une résistance optimisée contre chaque assaillant.

I.1.5.1. Les phytoalexines

Les plantes produisent un large éventail de métabolites secondaires, dont certains possèdent une activité antimicrobienne. Certains de ces métabolites, les phytoanticipines, sont produits de manière constitutive sous une forme inactive dans les cellules végétales (Osbourn, 1996). D'autres encore, appelés phytoalexines, sont activés suite à l'élicitation par un agent pathogène ou par une blessure (De Wit, 1997). Les phytoalexines peuvent être solubles dans le cytosol ou être liées à la paroi cellulaire, comme c'est le cas lors de la formation des papilles. Lors de la perception d'un agent pathogène, les phytoalexines sont synthétisées et se retrouvent concentrées à la zone d'infection ou de pénétration du microorganisme pathogène (Hammerschmidt, 1999).

Les phytoalexines sont de petites molécules dont les structures chimiques sont très variées. Les voies métaboliques menant à la synthèse d'une phytoalexine donnée sont souvent uniques à certaines familles, à certains genres, voire à certaines espèces végétales. En effet, la camalexine est une phytoalexine synthétisée chez *A. thaliana*. Ces composés sont regroupés en plusieurs familles, dont les composés phénoliques, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les polycétides. Les composés phénoliques comprennent les dérivés des phénylpropanoïdes, dont font partie les flavonoïdes, les isoflavonoïdes et la lignine. Certains de ces composés, dont la scopoletine produite chez le tabac, sont fluorescents après excitation aux rayonnements UV (Hahlbrock *et al.*, 2003; Hammerschmidt, 1999).

I.1.5.2. Les protéines PR

Les protéines reliées à l'agent pathogène (PR) regroupent les protéines dont la synthèse est induite par un stress biotique, en association avec la résistance. Certaines de ces protéines sont également produites en réponse à des stress abiotiques ou encore lors de certains stades de développement. La prévalence et les propriétés des différentes familles de protéines PR peuvent varier grandement d'une espèce végétale à l'autre. Elles peuvent notamment agir dans la signalisation liée à la défense, participer au renforcement de la paroi cellulaire, présenter une activité antimicrobienne ou stimuler la production d'autres protéines PR. Certaines PRs dégradent la paroi des champignons et les fragments libérés sont reconnus en tant que MAMP (Morohashi et Matsushima, 2000; van Loon *et al.*, 2006).

Actuellement, dix-sept familles de protéines PRs sont reconnues, en plus d'une dix-huitième famille hypothétique. Le tableau 4 représente les différentes classes de protéines PRs reconnues ainsi que leurs propriétés. Les fonctions enzymatiques et les rôles de ces protéines n'ont pas été tous élucidés et certaines évidences suggèrent que les protéines PRs auraient plus

d'une fonction. À titre d'exemple, la PR10 est une ribonucléase qui pourrait également être un facteur de transcription. Certaines protéines possèdent des propriétés antifongiques, la PR1 par exemple, mais leur activité enzymatique est inconnue (Conrath *et al.*, 2002). À l'inverse, certaines protéines PRs ont une activité enzymatique reconnue, dont les chitinases des familles PR3 et PR4, mais elles présentent également des propriétés antibactériennes et antivirales (Thevissen *et al.*, 1999). Les PR1, dont la fonction est inconnue, sont souvent utilisées comme marqueurs de la résistance puisqu'elles sont omniprésentes lors de la mise en place des réponses de défense contre divers agents pathogènes. Les PR2 (β -1,3-endoglucanases) ainsi que les PR3 et PR4 (endochitinases) contribuent à limiter l'activité, la croissance et la prolifération des agents pathogènes, dont les champignons et les nématodes, mais également les insectes. Certaines PR4 posséderaient en outre une activité ribonucléase. Le rôle des protéines PR5 (homologue à la thaumatine) n'est pas bien compris, mais elles agissent contre divers groupes de microorganismes, dont les virus et les champignons (Morohashi et Matsushima, 2000; Ribeiro *et al.*, 2006; van Loon *et al.*, 2006). Des protéines présentant des homologies avec les protéines PRs ont été identifiées, mais ne peuvent être classifiées selon les critères de ces familles. Parmi celles-ci, on compte une amylase produite par le tabac, des HRGPs (Hydroxyprolin Rich Glyco Protein), des protéines riches en glycine, la protéine DRR206 du pois, des protéines inhibitrices de polygalacturonase, des lipoxygénases et des produits de gènes homologues aux lipases (Sachetto-Martins *et al.*, 2000; van Loon *et al.*, 2006).

Tableau 4. Les familles de protéines reliées à l'agent pathogène (PR)

Famille	Membre type	Propriété	Gène
PR-1	Tabac PR-1a	antifongique	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tabac PR-2	β -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> [Gns2 ('Glb')]
PR-3	Tabac PR-2	chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3, Chia</i>
PR-4	Tabac P, Q	chitinase type I, II	<i>Ypr4, Chid</i>
PR-5	Tabac « R »	homologue à une thaumatine	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomate Inhibiteur I	inhibiteur de protéinase	<i>Ypr6, Pis ('Pin')</i>
PR-7	Tomate P ₆₉	endoprotéinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Concombre chitinase	chitinase type III	<i>Ypr8, Chib</i>
PR-9	Tabac « peroxydase formant de la lignine »	peroxydase	<i>Ypr9, Prx</i>
PR-10	Persil « PR1 »	homologue à une ribonucléase	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tabac « classe V » chitinase	chitinase, type I	<i>Ypr11, Chic</i>
PR-12	Radis Rs-AFP3	défensine	<i>Ypr12, Thi</i>
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	thionine	<i>Ypr13</i>
PR-14	Orge LTP4	protéines de transfert de lipide	<i>Ypr14, Ltp</i>
PR-15	Orge OxOa (germine)	oxalate oxydase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Orge OxOLP	homologue à un oxalate oxydase	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tabac PRp27	inconnue	<i>Ypr17</i>

(tiré de van Loon *et al.*, 2006)

I.1.5.3. Réaction hypersensible

La réaction hypersensible (RH) est un type de mort cellulaire programmée (MCP), à l'instar de l'apoptose chez les cellules animales. Cette réponse de défense est donc programmée génétiquement et nécessite une cellule végétale métaboliquement active (Gilchrist, 1998). La RH agit en concomitance avec d'autres réponses de défense et vise essentiellement à

restreindre la progression de l'envahisseur au site de l'infection et à alerter les cellules avoisinantes afin que celles-ci mettent en place des réponses de défense contre l'assaillant. La RH constitue le point culminant de la résistance dans le cadre de plusieurs interactions plante-agent pathogène (Greenberg et Yao, 2004). Dans d'autres cas, les cascades de transduction de signaux médiées par les protéines R sont suffisamment robustes et rapides pour contrer la progression de l'envahisseur sans l'aide de la RH. En outre, la RH n'est pas souhaitable lors d'une infection par un microorganisme pathogène nécrotrophe, lequel bénéficierait de la mort des cellules pour sa progression (Kiraly *et al.*, 2007). L'AS, le H₂O₂, le NO, et les cascades de MAPKs constituent les principaux acteurs de l'induction de la RH, bien qu'elle semble également être régulée en partie par des voies indépendantes de ces facteurs. La reprogrammation métabolique menant à la RH débute en moins d'une heure et les signes visibles de la MCP apparaissent six heures après l'infection par l'agent pathogène (Huckelhoven, 2007). En revanche, la RH nécessite une surveillance métabolique étroite pour que cette réponse reste confinée à la cellule infectée et ne soit pas nuisible aux cellules avoisinantes. Cette régulation s'effectue entre autres par le renforcement des parois cellulaires et la détoxification des ROSs médiée par le NO, de même que la production d'enzymes et d'antioxydants (Greenberg et Yao, 2004; Lamb et Dixon, 1997).

I.1.6. Résistance systémique

L'état de résistance activé localement se propage souvent au-delà de l'endroit où la plante a été agressée. On appelle cet état; résistance systémique acquise (SAR) lorsque l'envahisseur est un biotrophe ou induite (ISR), dans le cas d'un nécrotrophe (Van Loon *et al.*, 2006) (Figure 8). Au cours de la mise en place de la SAR, un certain nombre de gènes sont activés. À savoir, *NPRI*, le suppresseur de désaturase d'acide gras 1 (*SFDI*) et le déficient en résistance induite 1 (*DIR1*) (Grant et Lamb, 2006). Ces derniers permettent l'induction et le maintien

d'un état de résistance de la plante entière contre un large spectre d'agents pathogènes (Grant et Lamb, 2006).

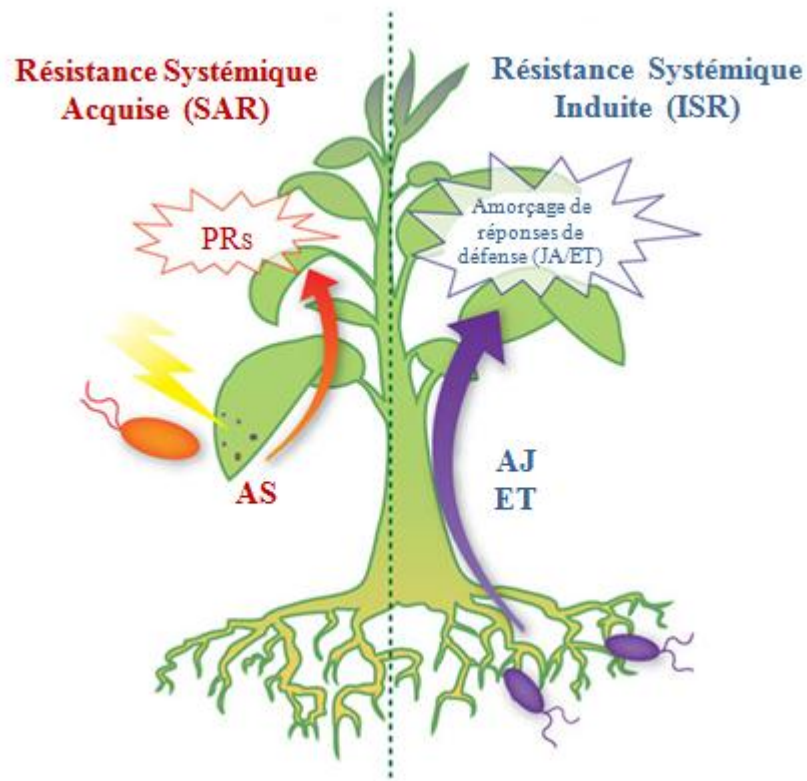


Figure 8. Représentation schématique des réponses immunes systémiques (Adapté de Pieterse *et al.*, 2009).

I.2. L'ARN d'interférence

En 2006, les deux scientifiques Andrew Z. Fire et Craig C. Mello ont reçu le prix Nobel de Physiologie et Médecine pour avoir découvert l'ARN d'interférence et l'inhibition de l'expression génique (ou *gene silencing*) par un ARN double brin. Bien avant cela, au début des années 1990, ce phénomène fut découvert, lors des tentatives de surexpression de gènes de

pétunia *via* des transgènes. En effet, une réversion du phénotype fut observée soulevant ainsi plusieurs questions. Cette découverte surprenante eu comme explication la dégradation spécifique des transcrits surexprimés (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). L'élément promoteur de ce mécanisme est une molécule d'ARN double brin (ARNdb). Ce mécanisme se base sur l'homologie de séquences, d'où il y a inhibition des séquences hautement ou parfaitement homologues à la molécule d'ARNdb initiale (Fire *et al.*, 1998; Wesley *et al.*, 2001). Ce processus peut agir aussi bien au niveau de l'ADN qu'au niveau de l'ARN. Dans le premier cas, il y a verrouillage des gènes par méthylation de l'ADN et/ou des histones contigus. Dans ce cas il s'agit de l'extinction génique transcriptionnelle (TGS) par formation et maintien d'hétérochromatine (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Alors que dans le cas où la molécule cible est l'ARN, il est nommé extinction génique post-transcriptionnelle (PTGS) chez les plantes, ARN d'interférence chez les métazoaires (ARNi) et « quelling » chez les champignons. Il permet le clivage endonucléolytique de l'ARN messager (ARNm) ou la répression traductionnelle. L'ARNdb est dégradé ainsi par l'enzyme DCL (Dicer-Like) en petits ARNs de 18 à 25 nucléotides (sARNs). Ces derniers sont reconnus par le complexe RISC. Ces complexes balayent la cellule à la recherche des acides nucléiques présentant une complémentarité de séquence. D'ailleurs, cette complémentarité peut être aussi bien partielle que parfaite. Les complexes RISC eucaryotes contiennent toujours un membre de la famille des protéines ARGONAUTES (AGO), qui ont un domaine de liaison aux petits ARNs dénommé PAZ (Parker *et al.*, 2006). Ils ont aussi un domaine PIWI avec des résidus catalyseurs conférant l'activité endonucléolytique aux complexes RISC programmés pour cliver l'ARN (Parker *et al.*, 2006).

I.2.1. Méthylation de l'ADN

Le clonage et le séquençage à haut-débit montrent que le répertoire des sARNs chez les plantes est largement dominé par un océan de petits ARNs d'interférence (siARNs) agissant principalement au niveau de la chromatine et se situant au niveau des loci des transposons et

de l'ADN répété. Ces siARNs de 24 nt associés à l'hétérochromatine sont façonnés par DCL3 ou par son substitut DCL2 et incorporés dans AGO4 ou AGO6 pour guider la méthylation de la cytosine dans tous les contextes de séquence. Cette voie est nommée méthylation de l'ADN dirigée par l'ARN (RdDM). Ils sont souvent décrits en tant que siARN agissant en *cis*, parce qu'ils affectent les loci génomiques qui les produisent, ce qui entraîne souvent leur extinction génique transcriptionnelle (TGS) (Bartel, 2004; Jones-Rhoades *et al.*, 2006).

I.2.2. La voie antivirale

La notoriété du PTGS tient surtout à son rôle dans la défense contre les virus (Lindbo *et al.*, 1993; Waterhouse *et al.*, 2001). Des tentatives d'exprimer un gène endogène à partir d'un vecteur viral recombinant n'ont pas abouties à l'accumulation de la protéine mais plutôt à la dégradation spécifique de l'ARNm correspondant (Ruiz *et al.*, 1998). Dans la littérature on nomme ce phénomène extinction génique induite par le virus (VIGS), médié par une molécule d'ARNdb formée au cours de la réplication du virus. Cette molécule d'ARNdb prend naissance grâce à une ARN polymérase dépendante de l'ARN (RDR). La RDR mise en place pour produire la molécule d'ARNdb peut être aussi bien d'origine virale, dans le cas des virus à ARN, que d'origine végétale, dans le cas des virus à ADN (Wang *et al.*, 2010). En effet chez *A. thaliana*, on dénombre six RDR putatives dont deux ont été validées; à savoir, RDR2 et RDR6 (Wang *et al.*, 2010). Il est connu que les ARNs polymérase ARN dépendantes (RDR6) sont requises pour l'amplification des signaux d'interférence à l'ARN. En effet, les microARNs (Paragraphe I.2.3), dont la taille est de 22 nucléotides, sont nécessaires pour amorcer la production des siARNs secondaires dépendants de RDR6 (Cuperus *et al.*, 2010). Le VIGS a été suggéré comme étant une manifestation de l'extinction génique dont le rôle est une défense antivirale (Ratcliff *et al.*, 1999). De nos jours, plusieurs indications suggèrent que l'extinction génique mise en place pour contrer les virus, est une voie de la réponse immune primaire (Ding et Voinnet, 2007).

I.2.3. La voie des microARNs

La deuxième catégorie de petits ARNs, la plus abondante chez les végétaux, est celle des miARNs. Ces petits ARNs sont plus facilement détectés chez les mutants « knockouts » *rdr2* ou *dcl3* où la voie de biogenèse des siARNs, est altérée. Les miARNs végétaux font partie d'une catégorie quasi-omniprésente de molécules d'ARN allant de 20 à 24 nt qui régulent l'expression des gènes eucaryotes post-transcriptionnellement.

I.2.3.1. Découverte des microARNs

Le premier miARN ainsi que sa première cible ont été décrits en début des années 90 (Lee *et al.*, 1993). Les observations faites au cours de cette découverte furent considérées comme une curiosité excentrique. En effet, le gène *lin-4* code un ARN court qui agit sur le gène *lin-14* car le miARN *lin-4* s'apparie sur la région 3'UTR non traduite de l'ARNm *lin-14*. Puis, d'autres miARNs ont été trouvés chez les vers, certains présentant des homologies de séquence avec des gènes similaires chez les animaux et les plantes, suggérant que ce mécanisme pouvait être plus étendu qu'on ne le pensait initialement. Ainsi en 2004, les chercheurs commencèrent déjà à parler d'un monde des ARNs courts impliqués dans la régulation génique (Lee *et al.*, 2004). Ce champ d'investigation s'est développé très rapidement, en un peu près une quinzaine d'années, à partir d'un phénomène obscur, jusqu'au prix Nobel. La rapidité dans les progrès obtenus sont peut être la conséquence de l'utilisation de plusieurs modèles d'étude (levure, plante, vers) et de plusieurs approches (génétique, biochimique, études structurales et bio-informatiques).

I.2.3.2. Caractéristiques générales des microARNs

Ces ARNs existent aussi bien chez les animaux, y compris chez les humains, que chez les végétaux. Ils sont considérés comme des éléments fondamentaux de la régulation génique à spécificité de séquence (Voinnet, 2009). De par leur implication dans le «gene silencing» aussi bien sur le plan transcriptionnel (TGS pour «Transcriptionnal Gene Silencing») que sur le plan post transcriptionnel (PTGS pour «Post Transcriptionnal Gene Silencing»), les miARNs sont capables de se déplacer à travers la plante de leur site de synthèse vers les cellules où le signal de l'interférence à l'ARN est requis. Ce déplacement se fait de cellule à cellule ou entre les organes en empruntant le réseau vasculaire. (Melnik *et al.*, 2011). Au cours de leur maturation, les miARNs sont retrouvés sous différentes formes. Ils sont tout d'abord attachés à un précurseur, puis sous forme de tige/boucle, puis finalement sous forme linéaire incorporée dans un complexe de l'interférence à l'ARN. L'interférence à l'ARN opérée par les miARNs est constituée, selon un schéma consensus, de quatre étapes chez les eucaryotes. La première étape consiste en une induction de l'interférence à l'ARN par un ARNdb. Ensuite un clivage de l'ARNdb en ARNsb d'environ 18 à 25 nucléotides. Puis une méthylation des extrémités 3'OH de l'ARNsb et enfin l'incorporation des brins d'ARNs méthylés dans un complexe effecteur qui va s'associer avec un brin d'ADN ou d'ARN cible parfaitement ou partiellement complémentaire (Chapman et Carrington, 2007). La création de ce complexe effecteur de l'ARNi va permettre le clivage des ARNs cibles en faisant appel à une exoribonucléase ou à la méthylation de l'ADN cible.

À l'inverse des miARNs d'animaux, la plupart des miARNs de plantes sont des transcrits issus de régions intergéniques du génome. Ceux des animaux proviennent des exons et surtout des introns de régions codantes pour des protéines. (Baskerville et Bartel, 2005). Les miARNs de plantes sont donc codés à partir de leur propre unité de transcription (Reinhart *et al.*, 2002). Ces unités sont appelés conventionnellement les gènes *MIR*. L'arrangement des gènes *MIR* chez les plantes ne semble pas être polycistronique contrairement à celui des animaux. (Bartel,

2004). Ceci dit, leur regroupement en tandem existe et a été retrouvé à titre d'exemple chez le soja (Zhang *et al.*, 2008).

Vu le nombre grandissant de miARNs découverts et le rythme exponentiel que prennent les recherches qui s'intéressent à ces ARNs ou qui les utilisent comme outil d'inactivation génique, une base de données a été créée par la Faculté des Sciences de l'Université de Manchester pour les regrouper (<http://www.mirbase.org>). Elle est considérée comme une référence, parmi d'autres bases de données, pour être la plus d'actualité dans le recensement de miARNs eucaryotiques et plus récemment de virus (Kozomara et Griffiths-Jones, 2011).

À la dernière mise à jour qui date de juin 2013, on comptait 638 séquences de précurseurs de microARNs et 863 miARNs matures des plantes modèles *Arabidopsis* dans les deux genres *thaliana* et *lyrata* ainsi que *Brassica napus*, *oleracea* et *rapa*. Si on se base sur leur évolution, la multitude de gènes *MIR* des plantes étudiées jusqu'à aujourd'hui peuvent être divisés en deux catégories majeures. Le premier groupe comporterait les gènes les plus conservés et donc probablement les plus «vieux». Une vue d'ensemble des gènes de ce groupe montre que leurs transcrits jouent un rôle dans des fonctions aussi diverses que la régulation de facteurs de transcription impliqués dans les fonctions des méristèmes, la polarité et la différenciation des organes, la division cellulaire ainsi que les fonctions hormonales (Garcia, 2008). Le second groupe comporterait quant à lui des gènes beaucoup plus récents et moins «rigides» du point de vue de leur conservation, comme les a qualifié Voinnet (Cell Review, 2009). Ces gènes «nouveaux» sont retrouvés, à l'encontre de ceux du premier groupe, en copies uniques (Zhang *et al.*, 2006). Ils s'expriment plus conditionnellement en réponse au stress environnemental ou uniquement dans certains types cellulaires et pas d'autres. Néanmoins, la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle même des gènes *MIR* reste un sujet très peu développé.

I.2.3.3. Biosynthèse des microARNs

La biosynthèse des miARNs fait intervenir une multitude d'effecteurs protéiques. L'endonucléase de type RNase III «Dicer-Like» (DCL) et la protéine Argonaute (AGO) en sont les plus importantes. La protéine DCL contient généralement 6 différents domaines dont les plus importants sont le domaine PAZ (Piwi Argonaute and Zwiile) et RNase III qui sont impliqués dans la liaison et le clivage des ARNs double brins (Macrae *et al.*, 2006). La protéine AGO quant à elle contient deux domaines conservés de type Piwi et PAZ. Le domaine Piwi a une similarité fonctionnelle et structurale avec l'enzyme RNase H (Song *et al.*, 2004). Il est important de noter que chez *A. thaliana*, ces protéines appartiennent à des familles multigéniques. Il existe quatre protéines DCL et dix protéines AGO, différentes les unes des autres. DCL1 et AGO1 semblent, en revanche, les seules à être impliquées dans la voie de biosynthèse des miARNs (Laubinger *et al.*, 2010; Höck et Meister, 2008).

Comme indiqué plus haut, les miARNs des plantes sont transcrits à partir de leur propre gène *MIR*. Leur biosynthèse se fait en quatre étapes clés :

- 1- Transcription et clivage du miARN : après transcription du gène *MIR* par l'ARN polymérase II, le transcrit primaire appelé pri-miARN subit un double clivage par la DCL1 pour obtenir le pré-miARN.

Un premier clivage est opéré pour dégager la structure en tige/boucle du miARN, un second se produit à l'intérieur même de la boucle pour donner un duplex composé de deux miARNs : miARN/miARN* (le premier étant le miARN propre à l'ARNi et le second est destiné à la dégradation).

Lors du clivage, trois autres protéines sont nécessaires en plus de la DCL1 à savoir :

- La protéine SERRATE (SER) : elle possède un motif en doigt de zinc.
- La protéine HYL1 (Hyponastic Leaves 1) : elle se lie aux ARNs double brins.

- Le complexe CBC : il se lie aux coiffes des ARNs.
Ces protéines vont permettre le cheminement des pri-miARNs vers les D-bodies (corps-D) qui sont les centres où a lieu le clivage par la DCL1 pour obtenir le pré-miARN (Voinnet, 2009).
 - 2- Méthylation du duplex miARN/miARN* : dans cette étape, le principal intervenant est la protéine HEN1 (HUA Enhancer 1) qui va méthyler les deux ARNs du duplex pour éviter leur dégradation par l'exonucléase SDN (Small RNA Degrading Nuclease) dans le cytoplasme (Yu *et al.*, 2005).
 - 3- Export vers le cytoplasme : ce transport du duplex méthylé est opéré par le transporteur nucléocytoplasmique HASTY (HST) (Bollman *et al.*, 2003).
 - 4- Incorporation du miARN actif dans la protéine AGO1, création du complexe RISC (RNA-induced Silencing Complex) et dégradation du miARN*.
- Ces différentes étapes sont illustrées à la figure 9.

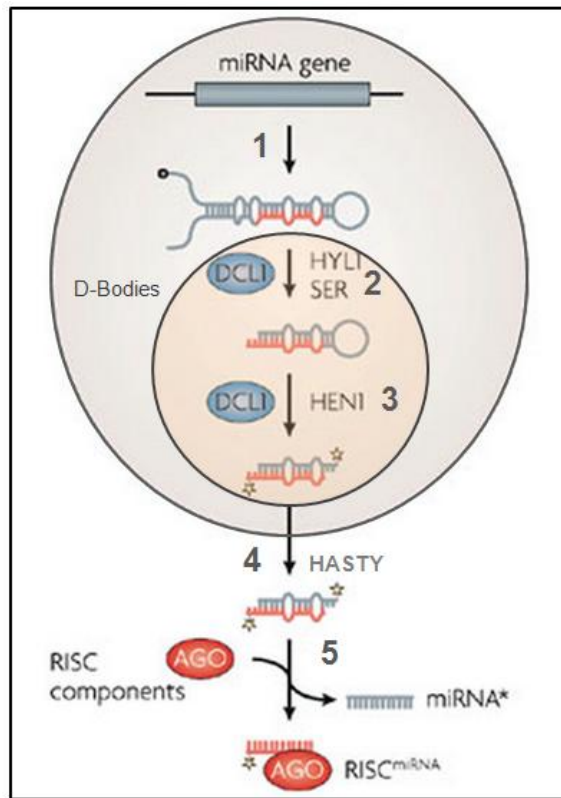


Figure 9. Schéma de la biogenèse d'un miARN à partir d'un gène *MIR*.

(1) Transcription du gène *MIR* par l'ARN pol II et obtention du pri-miARN. (2) Premier clivage par la DCL1 en concert avec HYL1 et SER pour obtenir le pré-miARN. (3) Second clivage par DCL1 et obtention du duplex miARN/miARN* et méthylation par HEN1. (4) Transport du noyau vers le cytoplasme à travers HASTY. (5) Dégradation du miARN* et incorporation du miARN actif dans AGO1 pour former le complexe RISC. (Adapté d'après Chapman et Carrington, 2007)

I.2.3.4. Mode d'action et régulation génique

Le mode d'action des miARNs peut être divisé en deux catégories majeures selon le moment de son déroulement par rapport à la transcription du gène cible.

I.2.3.4.1. Régulation génique transcriptionnelle

Ce niveau de régulation peut se faire de deux manières :

- Par clivage de l'ARN messager cible : généralement, les miARNs possèdent une haute complémentarité avec des séquences d'ARNm cibles qu'ils sont supposés cliver. Le mode de clivage stipule que le miARN guide le complexe RISC vers le site de clivage sur la séquence cible. Un clivage est fait au niveau de la liaison phosphodiester reliant les nucléotides 10 et 11 du miARN (Llave *et al.*, 2002). Les fragments clivés sont par la suite relâchés pour être dégradés par l'exonucléase XRN4 (Souret *et al.*, 2004). Ceci implique donc que les miARNs régulent négativement leurs cibles. La figure 10 représente un exemple de clivage de l'ARNm du gène At3g26810 par le miARN miR393a. Le clivage est assuré par le domaine Piwi de l'AGO1 (Baumberger et Baulcombe, 2005).

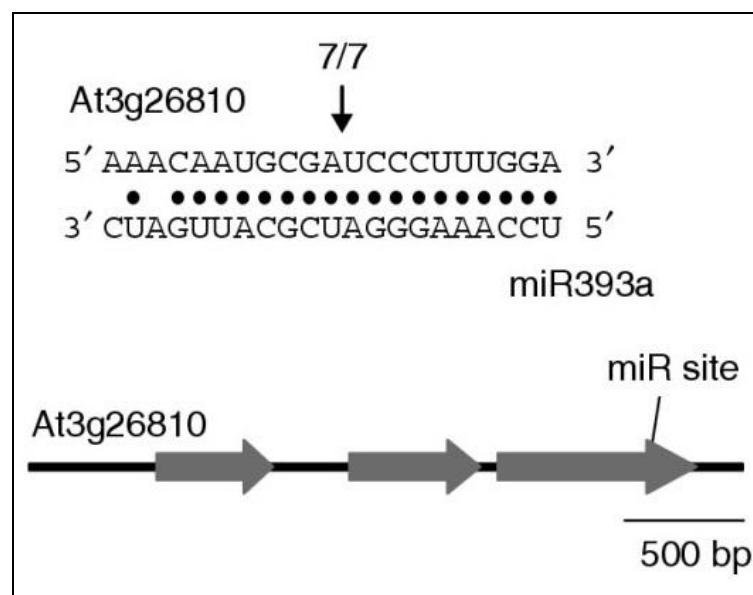


Figure 10. Alignement et mise en évidence du site de clivage au niveau du transcrit du gène At3g26810 par le miR393a (Wang *et al.*, 2004).

- Par inhibition Transcriptionnelle : ce mode d'inhibition consiste en une méthylation de l'ADN au niveau de l'hétérochromatine. Ce type d'interférence à l'ARN correspond plus spécifiquement à l'établissement et/ou au maintien de la liaison covalente ADN/histones au niveau des zones transcriptionnellement silencieuses (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Cette inhibition nécessite l'incorporation d'un miARN dans un complexe RITS (RNA-induced Transcriptional Silencing) qui va induire une reconnaissance entre le miARN et son ARNm cible. Ce duplex va initier une méthylation de l'ADN au niveau de la zone de complémentarité. L'inhibition transcriptionnelle est mise en place lorsque le ratio miARN/ARNm cible est élevé (Khraiweh *et al.*, 2010). La figure 11 résume l'incorporation du miARN dans le RITS et l'amorçage de l'inhibition par méthylation.

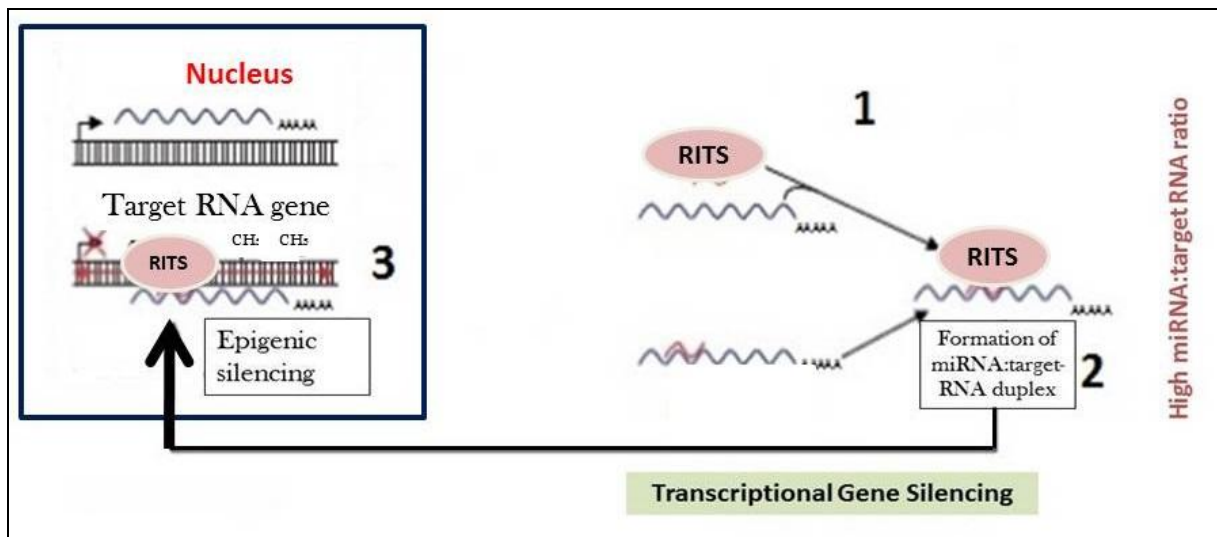


Figure 11. Modèle d'interférence transcriptionnel par miARN intégré dans un complexe RITS.

(1) Formation du duplex miARN/ARNm cible et incorporation du miARN dans le complexe RITS. (2) Translocation du duplex vers le noyau cellulaire. (3) Initiation de la méthylation de l'ADN cible au niveau des séquences complémentaires au miARN. Le RITS enclanche une méthylation sur la totalité du locus. (adapté d'après Khraiweh *et al.*, 2010)

I.2.3.4.2. Régulation génique post-transcriptionnelle

En plus de leur rôle dans l'interférence à l'ARN au niveau des transcrits cibles, les miARNs peuvent intervenir en inhibant la traduction et en empêchant, par conséquent, l'accumulation de protéines. Beaucoup de travaux ont mis en évidence ce mécanisme en rapportant un niveau inchangé de transcrits contre une baisse remarquable du niveau de protéines sur «western blots». Le PTGS est mis en place lorsque le ratio miARN/ARNm cible est faible (Khraiwesh *et al.*, 2010). La figure 12 illustre l'exemple de l'accumulation du miR172 contre une baisse de l'accumulation de la protéine «APETALA2-like» (AP2-like) qu'il régule négativement.

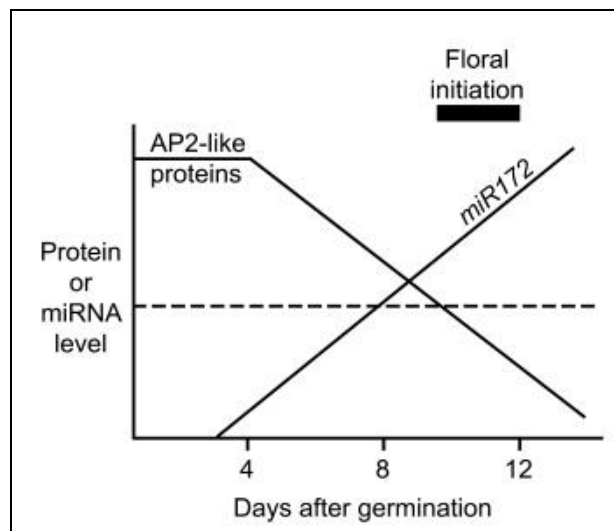


Figure 12. Régulation négative temporelle des protéines AP2-like par le miR172 responsable de la floraison chez *A. thaliana* (Aukerman et Sakai, 2003).

L'inhibition de la traduction se fait par blocage de l'initiation de la traduction en amont de l'ORF pour «Open Reading Frame». La figure 13 présente un modèle de ce blocage.

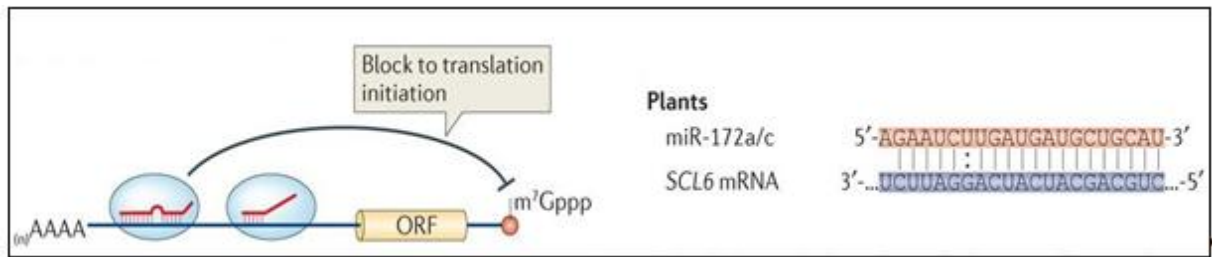


Figure 13. Présentation schématique du blocage traductionnel induit par le miR172a/c au niveau de l'ARNm cible codant la protéine «ScareCrow-Like 6» (SCL6) (Ameres et Zamore, 2013).

I.2.3.5. Importance des microARNs dans la régulation génique chez les plantes

Les miARNs sont impliqués dans plusieurs processus nécessaires au développement de la plante tels que :

- La transition entre les différents stades du développement embryonnaire
- La polarité des organes
- Les voies de signalisation par l'auxine
- Le métabolisme des ARNs
- Les réponses aux stress biotiques et abiotiques

La figure 14 montre la différence entre une plante sauvage d'*A. thaliana* en comparaison avec un mutant du miR159ab.



Figure14. Différence phénotypique entre la plante sauvage (wt) et le mutant *mir159ab* (Allen *et al.*, 2007).

Les différentes implications des miARNs dans les processus de développement ont été mises en évidence par les phénotypes résultants de mutations au niveau des gènes codant les différentes protéines intervenant dans la biogenèse des miARNs. Le phénotype le plus remarquable reste celui des mutants *dcl1*. Ces mutants présentent une perte partielle de fonctions avec un effet pléiotrope sur l'organogenèse, la morphologie des feuilles et des fleurs ainsi qu'une incapacité à l'initiation de méristèmes axillaires (Schauer *et al.*, 2002).

Par ailleurs, beaucoup d'autres fonctions ont pu être identifiées *via* l'analyse phénotypique de souches surexprimant les miARNs ou produisant des ARNms cibles résistants à un miARN donné (Tableau 5). Il en ressort que les miARNs jouent un rôle dans le développement de la plante.

Tableau 5. Quelques exemples de phénotypes résultants de mutants surexprimant des miARNs ou possédant des cibles résistantes à un miARN (adapté d'après Jones-Rhoades *et al.*, 2006).

Mutants Surexpresseurs			
miARN	Cible	Phénotype	Référence
miR156	Facteur de transcription SLP	Initiation foliaire augmentée – baisse de la dominance apicale – floraison retardée	Schwab <i>et al.</i> , 2005
miR160	Facteur de transcription ARF	Racines agravitropiques – coiffes racinaires désorganisées – augmentation du nombre des racines secondaires	Wang <i>et al.</i> , 2005
miR172	Facteur de transcription AP2-like	Floraison précoce – pétales manquants – sépales transformés en carpelles	Chen, 2004
miR399	Enzyme conjuguée à l'Ubiquitine	Accumulation du phosphate	Fujii <i>et al.</i> , 2005
Mutants à cibles de miR résistantes			
miR319	TCP2	Hypocotyles très développés – stature fragile – apex dominant	Palatnik <i>et al.</i> , 2003
miR164	CUC1	Pétioles peu développés – forme foliaire aberrante – pétales supplémentaires – sépales manquants	Mallory <i>et al.</i> , 2004
miR168	AGO1	Feuilles recroquevillées – phyllotaxie désorganisée – fertilité réduite	Vaucheret <i>et al.</i> , 2004

I.2.3.6. Dialogue

Récemment, on a mis en évidence la présence d'un dialogue entre la défense induite par les éliciteurs et le PTGS. En effet, ces recherches ont montré que certains éliciteurs stimulent l'activation du PTGS pour inhiber des régulateurs négatifs de la défense. On a montré que les petits ARNs de la plante jouent un rôle important dans l'immunité basale et spécifique chez *Arabidopsis* (Navarro *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011; Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006; 2007; Ruiz-Ferrer et Voinnet, 2009; Pumplin et Voinnet, 2013; Seo *et al.*, 2013). Le siARN endogène nat-siRNAATGB2 est induit par l'effecteur avrRpt2 de *P. syringae*. Cet ARN d'interférence réprime un régulateur négatif de la protéine CC-NB-LRR; RPS2 et permet ainsi la mise en place de la résistance spécifique médiée par cette molécule (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). Un autre exemple est celui du miR393 dont la transcription est induite par la Flg22 pour dégrader l'ARNm codant pour le récepteur de l'auxine TIR1 (F-box auxin receptor Transport Inhibitor Response 1) et les protéines reliées. En effet, cette répression mène à l'inhibition de la signalisation de l'auxine et conséquemment à la défense antibactérienne (Navarro *et al.*, 2006). Récemment, Zhang *et al.*, (2011) ont montré que le miR393*, lui aussi contribue à l'immunité surtout celle spécifique en modulant la sécrétion de PR1. L'importance du miR393 et du miR167 dans la coordination de l'interaction entre la plante et *Agrobacterium tumefaciens* a été aussi décrite (Pruss *et al.*, 2008). Le séquençage des petits ARNs liant AGO1 a amené à l'identification d'un nombre de microARNs qui sont régulés positivement ou négativement par la Flg22 (Li *et al.*, 2010). La surexpression de certains microARNs dans des plantes transgéniques stables a démontré que le miR160a régule positivement le dépôt de callose induit par les PAMPs, tandis que les miR398b et miR773 régulent négativement ce dépôt et compromettent ainsi la résistance à la bactérie (Li *et al.*, 2010). Il a été établi que les virus, les bactéries et récemment les oomycètes qui attaquent les plantes ont développé des supprimeurs de l'interférence à l'ARN qui ciblent plusieurs étapes clés de la voie de l'interférence à l'ARN. (Navarro *et al.*, 2008; Sansregret *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010; Burgyan et Havelda, 2011; Qiao *et al.*, 2013; Pumplin et Voinnet, 2013). Le supprimeur viral de l'interférence à l'ARN, P19 induit l'accumulation du miR168 chez

Nicotiana benthamiana et ceci est associé à l'inhibition de la traduction de sa cible à savoir *AGO1*. Ce qui mène à l'atténuation de la fonction antivirale de cette dernière (Varallyay *et al.*, 2010). Récemment, Boccara *et al.*, (2014) ont montré que la voie de l'interférence à l'ARN qui passe par le miR472 et RDR6 promeut la maladie causée par *P. syringae* DC3000 en supprimant l'immunité basale. Ceci suggère que les cibles de cette voie du miR472-RDR6 seraient impliquées dans la régulation de la réponse basale. Cependant, les évidences directes de ces propos restent encore inconnues. La protéine de résistance RPS5 est l'une des cibles du miR472, ceci expliquerait pourquoi la voie miR472-RDR6 supprimerait la résistance spécifique médiée par RPS5.

I.3. Agents pathogènes

Les agents pathogènes ont développé différentes stratégies pour pouvoir déjouer l'immunité des plantes. Deux types de relations peuvent se mettre en place :

Nécrotrophe : destruction à un stade précoce de la cellule végétale (exemples d'étude : *B. cinerea* et *Alternaria brassicicola*).

Hémibiotrophe ou Biotrophe : le parasite exploite la cellule végétale vivante lors des premiers stades d'infection (exemple d'étude : *P. syringae*).

Cette section décrit brièvement quelques mécanismes d'infection, ainsi que quelques données à propos des agents pathogènes faisant l'objet de cette étude.

I.3.1. Agents pathogènes nécrotrophes

Plusieurs moyens permettent la mise en place de l'infection. Les tubes de germination des conidies ou les spores peuvent infecter la plante en passant par la cuticule et la paroi par force mécanique, par voie lytique grâce aux enzymes, par les ouvertures naturelles (les stomates, les lenticelles...) ou encore par des blessures préexistantes. L'infection *via* le mycélium est aussi fréquente (Verhoeff, 1980). Chez certains champignons comme *A. brassicicola*, l'infection de l'hôte se fait par action enzymatique. En effet, ce champignon envahit les parties aériennes des plantes par la cuticule. Cette dernière est composée de dépôts de cire recouverts d'une couche d'acide gras hydrophobes qu'on nomme la cutine. *A. brassicicola* pénètre cette barrière de protection grâce à plusieurs sérines estérases (Berto *et al.*, 1999). Certains champignons tels que *B. cinerea* profitent des ouvertures naturelles comme porte d'accès pour infecter les parties aériennes des plantes (Figure 15). Après germination des spores, le tube germinatif se différencie en appressorium qui développe un hyphe. Ce dernier passe par le stomate. Aussitôt qu'il est dans la plante, le mycélium se développe en plusieurs hyphes qui envahissent les cellules et/ou l'espace intercellulaire de la plante où ils forment des haustoria (Agrios, 2005; Mendgen, 1996).

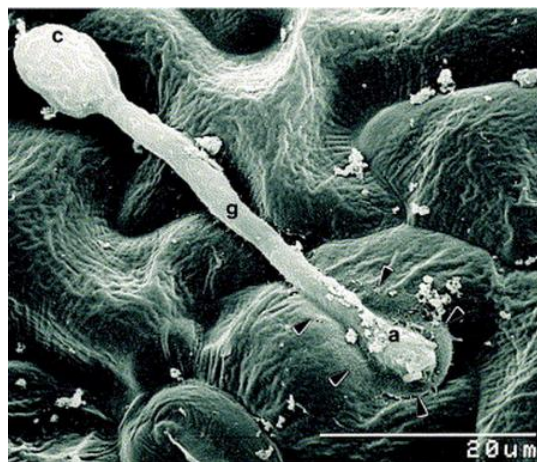


Figure 15. Germination et développement de l'appressorium d'une spore de *B. cinerea*.

a, appressorium; c, conidie; g, tube germinatif. Les flèches indiquent la démarcation autour du site de contact (Van Kan, 2006).

Modèle d'étude 1: *Botrytis cinerea*

La pourriture grise est l'une des maladies les plus dévastatrices qui attaque plusieurs des cultures maraichères cultivées sous serres. L'agent causal de cette pourriture est un champignon phytopathogène polyphage appelé *B. cinerea* (Figure 16) (Morrissey et Osbourn, 1999). L'impact économique de ce champignon est très important, car il sévit sur plusieurs cultures d'intérêt agronomique majeur comme la vigne, la tomate et le tournesol.

Le nom *B. cinerea* désigne la forme deutéromycète (asexuée) du champignon. Quant à la forme Ascomycète (sexuée), elle peut être obtenue au laboratoire, sous conditions contrôlées. Cependant, elle n'a été que très rarement observée dans la nature. Cette forme porte le nom de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary Whetz).



Figure 16. *B. cinerea* au microscope électronique (Niall Hamilton).

Le développement relativement rapide de *B. cinerea*, engendre chaque année la destruction de cultures pendant le stade de croissance ainsi que pendant le transport et le stockage des récoltes (Hammer *et al.*, 1990; Berrie, 1994). Il s'agit de l'un des champignons les plus dévastateurs à cause de son caractère polyphage. En effet, plus de 225 plantes, majoritairement dicotylédones, peuvent servir d'hôtes à ce champignon. Donc, à priori, ces plantes ne présentent pas de spécificité d'hôte. *B. cinerea* infecte préférentiellement les fruits, cependant tous les organes de la plante y sont potentiellement sensibles, et les symptômes sont multiples. On distingue par exemple le flétrissement des fleurs, les nécroses foliaires, la pourriture des racines, des tiges, ou celle des fruits. La complexité des processus de mise en place de la pathogénicité de *B. cinerea* est telle qu'elle recouvre pratiquement toute la palette des événements infectieux décrits chez les champignons parasites des plantes. Ce qui fait de ce champignon un excellent modèle d'étude permettant, d'une part, d'élucider le processus infectieux et d'autre part, l'identification des gènes impliqués dans la pathogénie (Choquer *et al.*, 2007). L'utilisation des fongicides, demeure le meilleur moyen de lutte contre ce champignon, mais toutes les molécules utilisées pour lutter contre *B. cinerea* ont, malheureusement, été contournées par l'apparition de souches résistantes au champ.

Le cycle de reproduction de *B. cinerea*, débute par la conidie ou spore qui représente la forme de résistance permettant au champignon de survivre aux conditions défavorables. Aussitôt que les conditions de température et d'humidité le permettent, la conidie germe et se différencie en hyphes dont l'ensemble constitue le mycélium. Selon les conditions environnementales, ce mycélium produira les organes reproducteurs, les conidiophores sur lesquels se forment les conidies ou les sclérotés qui sont des amas de mycélium très denses permettant de passer à travers les conditions défavorables. Ces sclérotés donnent naissance à des conidiophores (Agrios, 2005) (Figure 17).

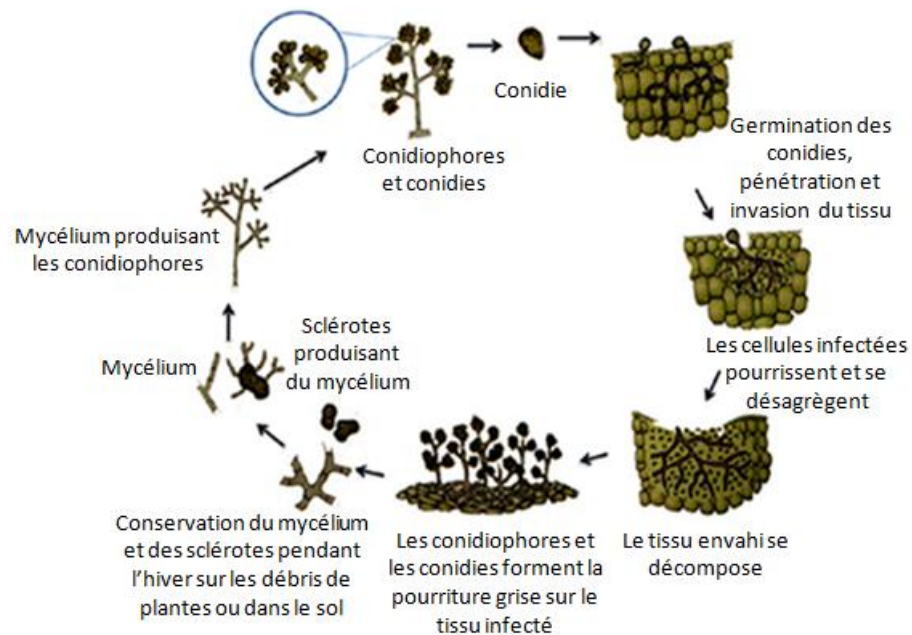


Figure 17. Cycle de vie de *B. cinerea* (Adapté d'Agrios, 2005).

Modèle d'étude 2: *Alternaria brassicicola*

Les maladies causées par les espèces appartenant au genre *Alternaria* sont très répandues dans le monde. En effet, ces champignons font partie de la flore fongique courante de tous les continents. Plusieurs plantes d'intérêt économique important sont attaquées par ce genre de champignon. *Alternaria* peut affecter les espèces hôtes à tous les stades de la croissance, y compris les semences (Valkonen et Koponen, 1990). Ce champignon attaque généralement les parties aériennes de ses hôtes. Chez les plantes feuillues, les symptômes d'infection sont typiquement des taches circulaires foncées (Figure 18 A). *A. brassicicola*, comme plusieurs autres espèces d'*Alternaria*, produit des toxines qui se diffusent dans les tissus de l'hôte. C'est ce qui explique le halo jaune qui entoure les taches foncées (Figure 18 A). *A. brassicicola* provoque l'alternariose dont les symptômes sont des taches foliaires foncées. Ce champignon attaque les crucifères (brassicacées) sauvages et cultivés (Smith *et al.*, 1988). Ce champignon appartient à la classe des *Dothideomycetes* et à la famille des *Pleosporaceae*.



Figure 18. A : Taches foliaires causées par *A. brassicicola* sur une feuille de chou d'abyssinie (*Crambe abyssinica*); B : conidies d'*A. brassicicola* disposées en chaîne (Adapté de Macagnan *et al.*, 2010).

Les spores de ce champignon ont besoin de certaines conditions environnementales dont la plus importante est l'humidité pour germer et infecter le plant hôte (Humpherson-Jones et Phelps, 1989). La pénétration se fait à travers une blessure ou les stomates (Figure 19). Les tissus stressés, faibles, vieux ou blessés sont plus susceptibles à l'infection. Les nouvelles conidies produites sur les tissus infectés vont réinfecter la plante (Figure 19).

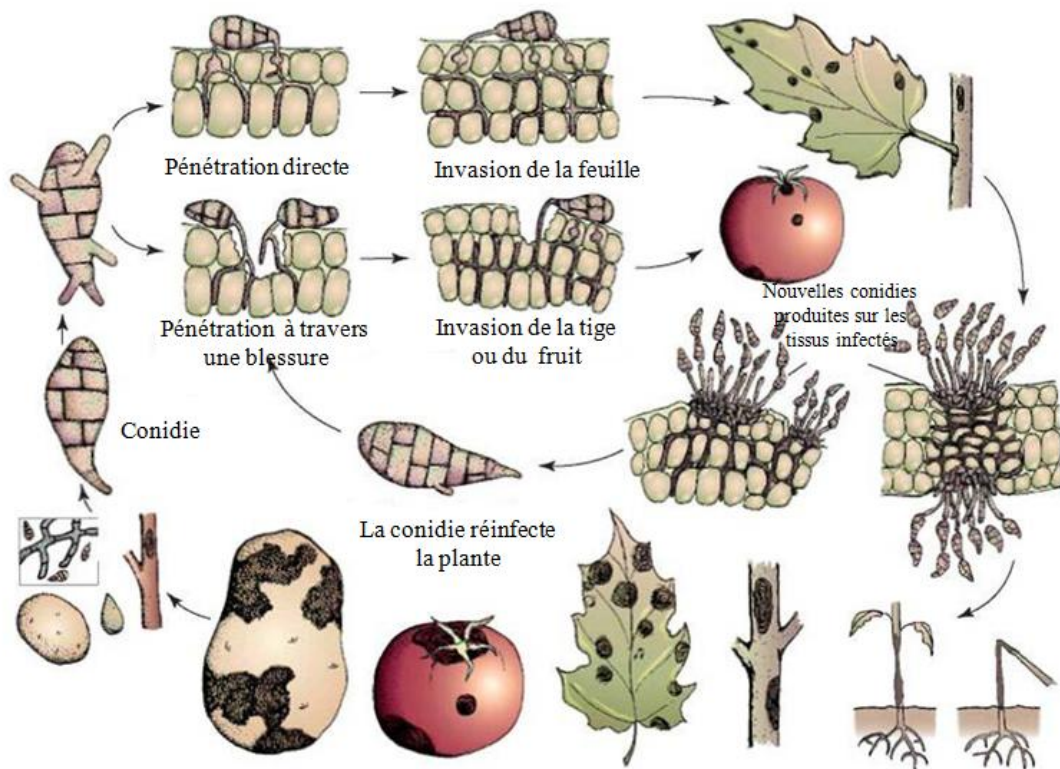


Figure 19. Développement et symptômes causés par *Alternaria* (Adapté d'Agrios, 1997).

I.3.2. Agent pathogène hémibiotrophe

Un agent pathogène hémibiotrophe est biotrophe dans les premiers stades de son cycle. Son développement nécessite des tissus vivants, à partir desquels il se nourrit sans causer la mort. Dans les stades plus avancés de l'infection, il mime un organisme nécrotrophe (ayant besoin de tissus morts). Ceci oblige la plante à déployer tous ses nutriments jusqu'à épuisement ce qui engendre la nécrose du tissu (Melotto *et al.*, 2008).

Modèle d'étude 3: *Pseudomonas syringae*

P. syringae est une bactérie phytopathogène ubiquiste (Figure 20). Elle se trouve dans le sol où elle joue un rôle important dans la fertilisation, dans les eaux douces et celles saumâtres ainsi que dans l'air (le vent contribue dans la dynamique des populations de *Pseudomonas*). *P. syringae*, est une bactérie aérobie stricte, Gram négative qui se déplace grâce à des flagelles polaires.

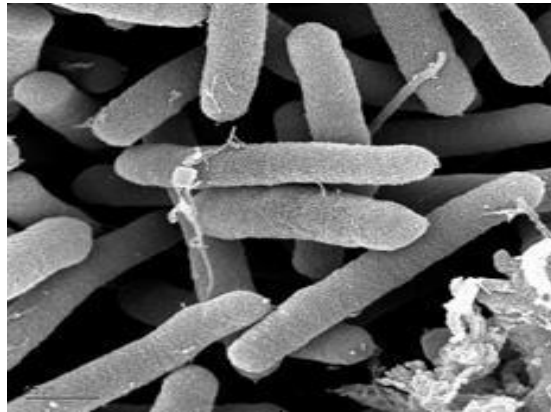


Figure 20. *P. syringae* au microscope électronique (Gordon Vrdoljak).

Cette bactérie appartient à la classe des *Gamma Proteobacteria* et à la famille des *Pseudomonadaceae*. L'espèce elle-même peut être divisée en pathovars (variants pathologiques ou *pv*) ou groupes caractéristiques d'une plante hôte. Ce pathogène comprend plusieurs pathovars. On en compte aujourd'hui un peu plus de 50 (Gardan *et al.*, 1999). Les plus étudiés sont *P. syringae pv. tomato* (DC3000), *pv. syringae* (B728a), *pv. phaseolicola* (1448A) et *pv. maculicola* (ES4326) (Preston, 2000; <http://www.pseudomonas-syringae.org>). Il est important de noter que les souches de *P. syringae* sont assignées à un pathovar particulier sur la base du spectre d'hôtes qu'elles sont capables d'infecter. Ce spectre d'hôte peut être composé d'espèces de plantes, ou plus spécifiquement, de cultivars d'espèces. Cette dernière classification se base sur les interactions différentielles souche-cultivar. (Melotto *et al*, 2008). La plupart des infections par *P. syringae* sont caractérisées par des symptômes communs tels

que des nécroses localisées et des décolorations des tissus infectés (chloroses) ainsi qu'une accumulation d'eau au niveau des apoplastes de ces tissus. Le tableau 6 résume les plus importants pathovars de *P. syringae* ainsi que les atteintes causées sur les plantes hôtes et la figure 21 montre les symptômes de différents pathovars de *P. syringae* sur différents cultivars.

Tableau 6. Pathovars, hôtes et symptômes liés aux infections causées par *P. syringae* (Weir, 2013).

Pathovars	Plante Hôte	Symptômes/Maladie
<i>P.s pv. syringae</i> (d)	<i>Syringa vulgaris</i>	Bactériose du lilas
<i>P.s pv. helianthi</i> (c)	<i>Helianthus annuus</i>	Taches jaunâtres sur les feuilles
<i>P.s pv. coronafaciens</i> (b)	<i>Avena sativa</i>	Taches entourées d'un halo vert clair
<i>P.s pv. actinidiae</i> (a)	<i>Actinidia deliciosa</i>	Chancre du Kiwi
<i>P.s pv. tomato</i> (e)	<i>Solanum lycopersicum</i>	Moucheture bactérienne sur la tomate.
<i>P.s pv. phaseolicola</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Taches entourées d'un halo sur les feuilles et la gousse.

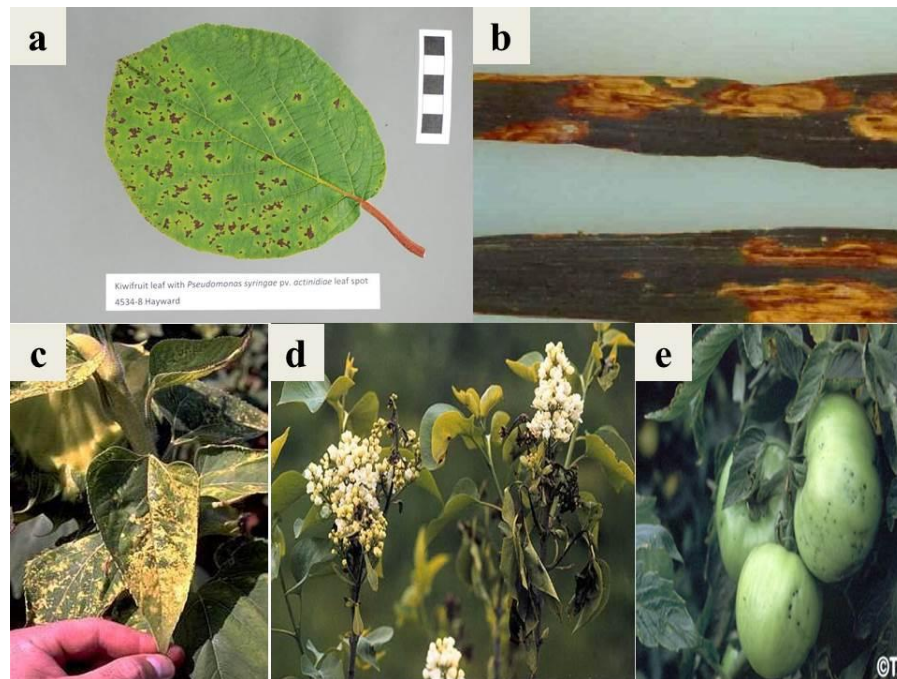


Figure 21. Symptômes de différents pathovars de *P. syringae* sur différents cultivars (pour (a), (b), (c), (d) et (e) voir Tableau 6) (Weir, 2013).

P. syringae pv. *tomato* DC3000 est un organisme modèle qui cause la moucheture bactérienne quand il infecte la tomate *Solanum lycopersicum*. Il est largement utilisé pour l'étude des interactions plante-agent pathogène sur le plan moléculaire. En plus de l'intérêt économique de l'étude de *P. syringae* pv. *tomato*, cette bactérie présente deux avantages majeurs : un génome entièrement séquencé et la capacité d'infecter la plante modèle *A. thaliana* (Buell *et al.*, 2003).

Pst DC3000 est un agent pathogène foliaire qui est déposé par le vent, l'eau ou les insectes sur la surface des feuilles. Son cycle de pathogénèse est divisé en deux phases :

- Une première phase épiphyte où il se multiplie à la surface de la feuille.

- Une seconde phase endophyte où il intègre l'apoplaste foliaire.

Étant donné que la surface foliaire est un environnement stressant pour le développement des microorganismes, les bactéries se multiplient préférentiellement à proximité des trichomes et des nervures (Hirano et Upper, 2000). Pour intégrer l'apoplaste, elles utilisent des portes d'entrée telles que les blessures à la surface des feuilles ou encore les stomates. Les stomates sont des pores foliaires qui assurent l'entrée de CO₂ dans la plante pendant la journée en restant ouverts tandis qu'ils contrôlent la transpiration la nuit en se fermant. Les stomates sont un choix de prédilection pour *Pst* DC3000 pour pénétrer à l'intérieur de la feuille. Ceci est dû à la forte densité de ceux-ci pouvant atteindre 300 stomates/mm² de surface foliaire. Cette dernière est régulée au cours du développement de la plante et dépend des stress environnementaux (Woodward, 1987). Durant la phase épiphyte, *Pst* DC3000 se multiplie de manière accélérée. Son caractère mobile lui confère un avantage pour se déplacer vers les stomates et s'introduire dans l'apoplaste foliaire. Une fois à l'intérieur, *Pst* DC3000 passe au stade endophyte et se multiplie de plus en plus agressivement jusqu'à épuiser la feuille et induire l'apparition de nécroses et de chloroses. Ces symptômes peuvent apparaître au bout de quelques jours seulement. La figure 22 montre le passage entre les deux phases épiphyte et endophyte.

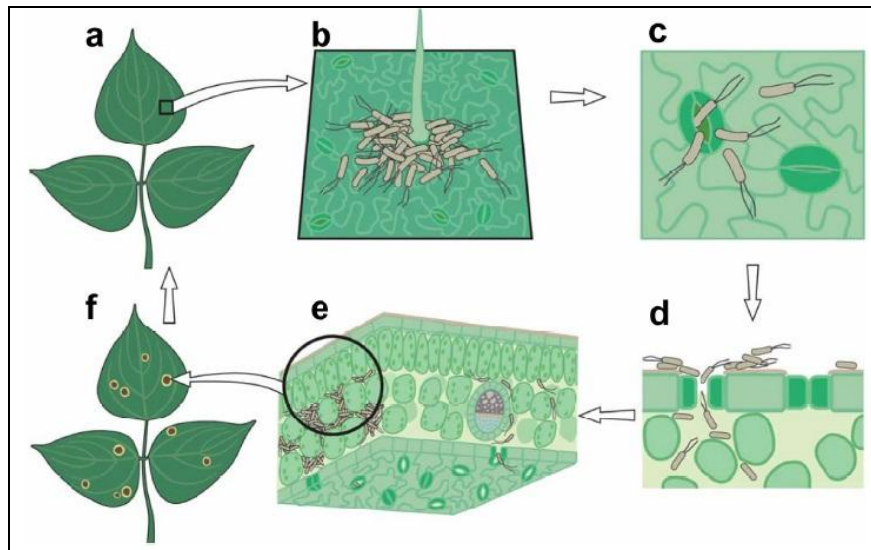


Figure 22. Schématisation du passage de *P. syringae* pv. *tomato* de la phyllosphère vers l'apoplaste foliaire.

(a) Diagramme de feuilles saines. (b) Agrégation bactérienne près d'un trichome. (c) Translocation de bactéries dans l'apoplaste à travers un stomate. (d) Coupe transversale d'une feuille infectée par des bactéries. (e) Multiplication exponentielle de bactéries dans l'apoplaste. (f) Apparition de nécroses et de chloroses foliaires (Melotto *et al.*, 2008).

Facteurs de virulence de *Pst* DC3000 :

Pour pouvoir contourner les mécanismes de défense de la plante et ainsi l'infecter, *Pst* DC3000 possède deux systèmes de virulence majeurs, à savoir :

Système de Sécrétion de Type III (TTSS)

Si *Pst* DC3000 est capable de se multiplier dans l'endophyte des feuilles, c'est bien grâce au TTSS. La structure de ce dernier, semblable au flagelle, permet à la bactérie d'injecter ses

effecteurs protéiques de type 3 (ET3) dans l'apoplaste. Ceux-ci vont être transloqués dans le cytoplasme et favoriser ainsi la colonisation de la plante (Galan et Collmer, 1999). Les composants du TTSS sont codés par deux groupes de gènes réunis en cluster localisé dans un îlot de pathogénicité (PAI pour «PATHogenicity Island») comme indiqué à la figure 23 (Collmer *et al.*, 2000). Les gènes *hrc* (pour «*hypersensitive response conserved*») sont hautement conservés chez plusieurs groupes de bactéries appartenant aux genres *Ralstonia*, *Xanthomonas* et *Erwinia*. Les gènes *hrp* (pour «*hypersensitive response and pathogenicity*») quant à eux ne sont pas aussi conservés que les précédents (Alfano et Collmer, 1997; Tampakaki *et al.*, 2010).

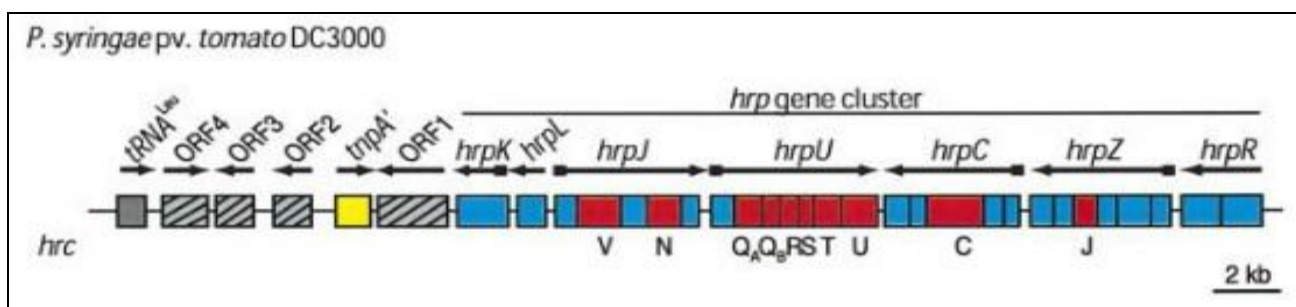


Figure 23. PAI *hrc/hrp* de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.

Ce cluster est encadré par deux régions : la «*Conserved Effector Locus*» (CEL) représentée en (gris) sur le schéma et l'«*Exchangeable Effector Locus*» (EEL) non représentée. (Bleu) : *hrp*, (Rouge) : *hrc*, (Jaune) : éléments mobiles. Les flèches indiquent le sens de transcription (D'après Büttner et Bonas, 2002).

Le TTSS nécessite l'expression d'un pilus codé par les gènes *hrp* (Roine *et al.*, 1997). L'unité structurale qui le compose est la protéine HrpA. Elle n'est pas conservée à travers les pathovars de *P. syringae* (Preston *et al.*, 1995). Ce pilus assure la translocalisation des ET3 à travers la paroi de la cellule végétale. La figure 24 illustre la structure d'un TTSS.

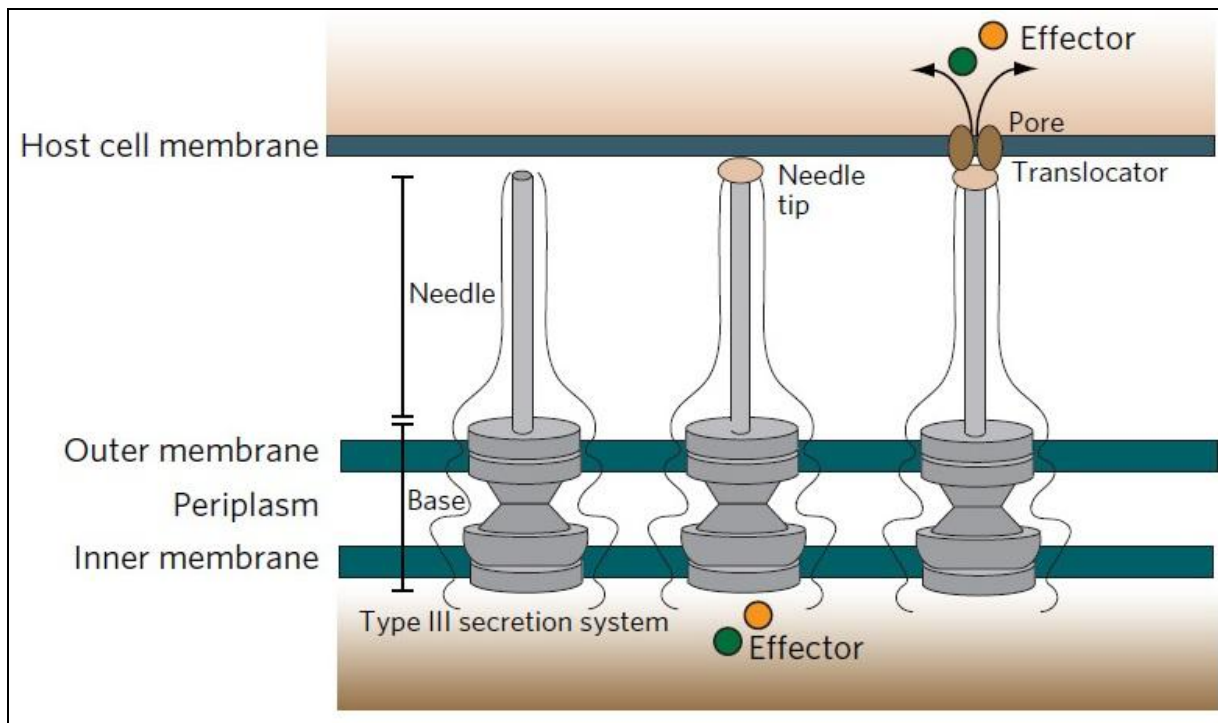


Figure 24. Schéma du TTSS.

Le TTSS est composé d'une base ancrée dans la membrane de la bactérie (en bas). Pour accéder à la cellule hôte, il y a déploiement d'une aiguille. Une fois la structure de l'aiguille complétée, sa pointe est mise en place. Dès que la pointe est en contact avec la cellule hôte, il y a activation du système et sécrétion de deux protéines de translocations qui vont assurer le passage des ET3 à l'intérieur de la cellule hôte à travers un pore qu'elles auront formé (D'après Ashida *et al.*, 2012).

Le PAI de *Pst* DC3000 code pour deux protéines particulières qualifiées de protéines accessoires au TTSS : HrpZ et HrpW, appelées également Harpins. Ce sont des protéines riches en glycine de type secrétées (Charkowski *et al.*, 1998). HrpZ semble interagir avec la paroi cellulaire (Hoyos *et al.*, 1996) alors que HrpW se lie au pectate (produit de dégradation de la pectine) (Charkowski *et al.*, 1998). Ces deux protéines sont, à elles seules, capables d'induire une réaction d'hypersensibilité (RH) chez *A. thaliana*. Il a été suggéré qu'elles pourraient être impliquées dans la translocation des ET3 vers le cytoplasme cellulaire de l'hôte en interagissant avec HrpA (Preston, 2000).

La coronatine (COR)

La coronatine est une phytotoxine composée de deux structures distinctes, à savoir, l'acide coronafacique (CFA) et l'acide coronamique (CMA) représentées à la figure 25.

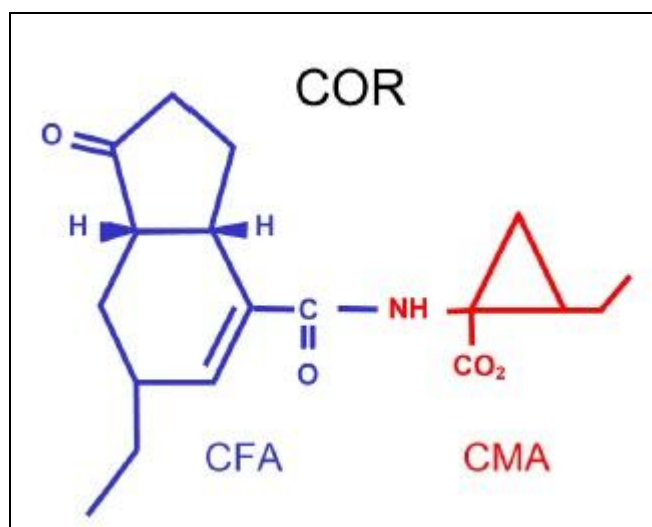


Figure 25. Structure de la coronatine.

(<https://pages.wustl.edu/kunkellab/research>).

La COR joue un rôle essentiel dans la virulence chez plusieurs pathovars de *P. syringae* (Mitchell, 1982). Elle permet la multiplication bactérienne dans l'endophyte *via* la stimulation de la réouverture des stomates post-infection. (Melotto *et al.*, 2006). En effet, après la perception de l'agent pathogène par la plante à partir de ses motifs moléculaires généraux PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), il y a fermeture des stomates pour empêcher l'entrée d'autres bactéries. En sécrétant la COR à l'intérieur de la feuille, *P. syringae* DC3000 amorce la réouverture des stomates. Ce processus est illustré à la figure 26.

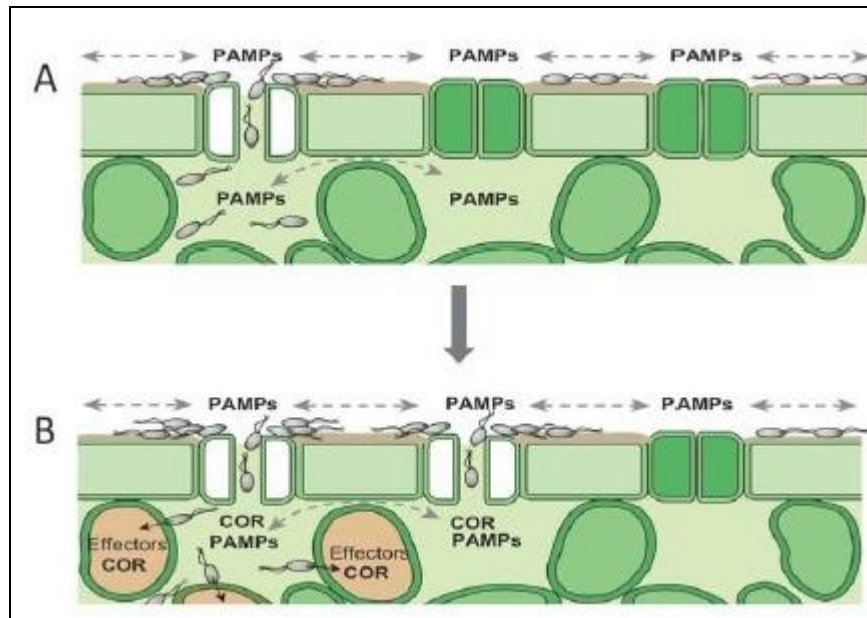


Figure 26. Effet de la coronatine sur les stomates.

(A) : Lors de la détection des PAMPs, la plante ferme ses stomates au site d'infection pour empêcher les bactéries d'entrer. L'agent pathogène aura déjà pris de l'avance en entrant dans l'endophyte avant le signal de fermeture. (B) : Une fois à l'intérieur, *P.syringae* sécrète la COR qui va déclencher la réouverture des stomates pour une entrée massive de bactéries (d'après Melotto *et al.*, 2008).

Par ailleurs, la COR semble mimer l'acide jasmonique (AJ), une phytohormone impliquée dans la voie de signalisation lors de l'exposition à un agent pathogène nécrotrophe (Farmer, 2003). La figure 27 montre la ressemblance structurale entre la COR et le JA-Ile (acide jasmonique conjugué à l'isoleucine).

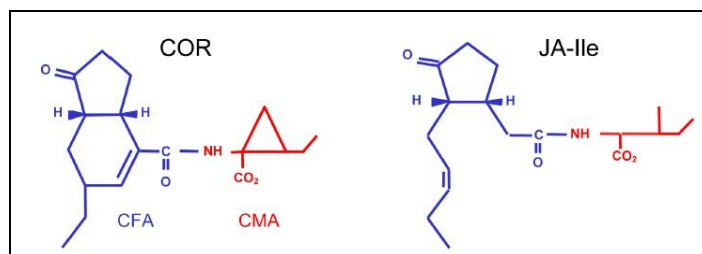


Figure 27. Similarité structurale entre la coronatine et l'acide jasmonique conjugué à l'isoleucine.

(<https://pages.wustl.edu/kunkellab/research>).

En effet, la COR induit des réponses similaires à celles déclenchées par l'AJ telles que l'induction d'inhibiteurs de protéases et de phytoalexines, ainsi que l'expression de chlorophyllase, enzyme impliquée dans la dégradation de la chlorophylle (Benedetti et Arruda, 2002). L'AJ est un antagoniste de l'acide salicylique (AS) qui lui est impliqué dans les voies de signalisation suite à l'exposition à un agent pathogène biotrophe. Il est essentiel pour la Résistance Systémique Acquise (SAR) (Pieterse *et al.*, 2009). *P. syringae* DC3000 est un agent pathogène hémibiotrophe. En sécrétant la COR qui mime l'AJ, cet agent phytopathogène bloque la voie de signalisation impliquant l'AS pour mieux infecter la plante (Feys *et al.*, 1994).

I.4. Objectifs du projet de recherche

Mon projet de recherche compte quatre principaux objectifs :

Objectif 1- Etude de l'implication de la voie des microARNs dans l'immunité des plantes

Pour répondre à l'hypothèse que les agents pathogènes pourraient utiliser des microARNs de l'hôte à leur avantage, j'effectuerai des tests d'infections sur les mutants de la voie des microARNs chez *A. thaliana*, à savoir *dcl1-9* et *ago1-27*, avec les champignons nécrotrophes *B. cinerea* et *A. brassicicola*.

Objectif 2- Caractérisation des miARNs régulés en réponse à l'infection

Pour identifier les miARNs régulés en réponse à l'infection, nous effectuerons une analyse grâce à une puce du type microarray de plantes d'*A. thaliana* infectées avec *B. cinerea*. Ensuite, je m'intéresserai à un microARN en particulier, le miR472 qui a déjà été montré ciblant plusieurs transcrits codant des CC-NB-LRR (Cuperus *et al.*, 2010). J'étudierai l'importance du miR472 dans l'interaction d'*A. thaliana* avec *B. cinerea* d'une part, et *A. brassicicola* d'autre part, grâce au mutant déficient *mir472* (Arabidopsis Biological Resource Center) que je caractériserai. Je quantifierai les niveaux d'expression de la défensine (*PDF1.2*), gène de défense dépendant de la voie de l'AJ pour expliquer le phénotype observé.

Le miR472 d'*A. thaliana* est un ARN de 22 nucléotides de long. Il a été montré que ce miR472 déclenche la biogenèse de siRNA dépendant de RDR6 à partir de transcrits NB-LRR (Cuperus *et al.*, 2010). Cela me conduit à aborder la question de savoir si la voie d'interférence qui passe par miR472-RDR6 a un rôle dans la promotion de la maladie causée

par *B. cinerea* et *A. brassicicola*. Pour ce faire j'infecterai des mutants *rdr6-15* avec ces deux champignons et je quantifierai le niveau d'expression de *PDF1.2*.

Objectif 3- Détermination des cibles régulées par certains miARNs

Plusieurs gènes codant pour des protéines CC–NB–LRR sont prédits comme cibles du miR472 (Cuperus *et al.*, 2010; Dai et Zhao, 2011). Je caractériserai huit mutants que j'infecterai avec *B. cinerea*. Ensuite, je montrerai que le mutant du gène At5g05400 NB-LRR (Salk_005464C), que nous appellerons RDS1 pour Reduced Disease Susceptibility 1, présente une forte susceptibilité à *B. cinerea* et *A. brassicicola*. Je quantifierai le niveau d'expression de *PDF1.2*.

Enfin, nous validerons le clivage de *RDS1* par le miR472 par la méthode d'amplification rapide des extrémités 3' d'ADNc (RACE 3').

Objectif 4- Étude de la mécanistique d'activation du miR472

J'ai choisi le modèle *A. thaliana*-*P. syringae* pour étudier la possibilité que les agents pathogènes pourraient manipuler le miR472 pour infecter la plante, car le système de virulence de cette bactérie est bien étudié dans la littérature (Galan et Collmer, 1999; Mitchell, 1982). Avant d'entamer cette hypothèse, il est important de vérifier si ce microARN est accumulé lors de l'infection par *P. syringae* et s'il promeut la maladie causée par cette bactérie grâce aux tests d'infection en un premier temps, ainsi que la quantification des marqueurs de défense reliés à la voie de l'AS à savoir *PR1* et *PR5* en un second temps. Ensuite, je me propose de voir si *RDS1* est impliqué dans la susceptibilité d'*A. thaliana* envers *Pst* DC3000. Par ailleurs, je regarderai si l'expression des marqueurs de la voie de l'AS, *PR1* et *PR5* est affectée lors de l'infection avec *Pst* DC3000 chez les mutants *rds1*. Puis, je vérifierai si *RDS1* est impliqué dans le PTI induit par la Flg22.

La question qu'on se pose ensuite est la suivante; est-ce que *P. syringae* est capable de manipuler le miR472 pour réguler négativement l'accumulation de RDS1 et favoriser ainsi l'infection? Pour répondre à cette question, j'étudierai les deux principales voies de virulence de *P. syringae*. Je m'intéresserai à la voie qui passe par la coronatine et je répondrai à la question comment cette phytotoxine active la transcription du miR472 grâce à l'étude du promoteur de ce microARN. Enfin, je montrerai l'implication du facteur de transcription MYC2 dans l'activation du miR472 par la coronatine.

CHAPITRE 2.

LES NÉCROTROPHES MANIPULENT LA VOIE DE MIR472-RDR6 EN CIBLANT UN CC-NB-LRR POUR INSTAURER LA MALADIE

2.1. Matériel et Méthodes

2.1.1. Modèle végétal et conditions de croissance

A. thaliana, écotype Columbia-0 (Col-0) a été choisie comme modèle d'étude. Les graines sont semées dans un terreau commercial standard sans ajout d'engrais. La croissance des plantes a été réalisée dans des chambres de culture (DiaMed Laboratory Supplies, On, Canada) avec 70% d'humidité relative et une température maintenue à 23°C le jour et 19°C la nuit. La photopériode est de 12 heures ($120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Pour toutes les expériences, les plantes sont âgées de 5 semaines.

2.1.2. Extraction d'ADN et géotypage

Les lignées transformées par insertion d'ADN-T, mir472 (salk_087945C), At5g43730 (salk_013860C), At5g47260 (salk_095083C), At5g05400 (salk_005464C), At4g27190 (salk_009665C), At4g10780 (salk_066132), At1g61310 (salk_125189C), At1g51480 (salk_068767C) et At1g12290 (salk_012475C) nous ont été fournies par NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Center) (Alonso *et al.*, 2003). L'ADN génomique a été isolé à partir de

deux disques foliaires de chaque lignée d'insertion d'ADN-T et du plant sauvage correspondant (Col-0). Les graines semées pour l'obtention des plantes mutantes sont issues de lignées génotypées et homozygotes. Les amorces utilisées pour le génotypage sont rapportées dans le tableau 1 en annexe.

2.1.3. Conditions de croissance des champignons et tests d'infection

L'isolat 191 de *B. cinerea* a été cultivé comme décrit dans la littérature (El Oirdi *et al.*, 2007; 2010; 2011; Abd El Rahman *et al.*, 2012; Gonzalez-Lamothe *et al.*, 2012). Pour les expériences de quantification de l'expression des gènes et l'analyse microarray, nous avons utilisé des plantes âgées de cinq semaines qu'on a pulvérisé avec 5×10^5 spores ml^{-1} de *B. cinerea* et que nous avons mis à incuber dans une chambre de croissance où l'humidité est élevée. L'eau a été utilisée pour le traitement des plantes contrôles. Les essais d'infection avec *B. cinerea* ont été réalisés en mesurant la surface de la maladie sur des feuilles détachées. Des feuilles issues de plantes âgées de cinq semaines ont été détachées et placées dans une boîte de Pétri avec le pétiole intégré dans un milieu solidifié à base de Murashige et Skoog avant l'inoculation avec une bouture de 3 mm de diamètre de gélose contenant des hyphes en croissance active de *B. cinerea* (El Oirdi *et al.*, 2007; 2010; 2011; Abd El Rahman *et al.*, 2012).

L'isolat 10051 d'*A. brassicicola* utilisé dans cette étude nous a été fourni par la collection de cultures fongiques canadiennes (Agriculture et Agroalimentaire Canada). Le champignon a été cultivé sur de la gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA). Pour les tests d'infection, on a utilisé des boutures de 3,5 mm de diamètre de gélose contenant des hyphes en croissance active d'*A. brassicicola*.

Pour les deux agents pathogènes, les surfaces de la maladie ont été mesurées 40 heures après inoculation. Tous les tests d'infection ont été effectués à 13h00 (photopériode commençant à 08h00) et les plantes inoculées ont été incubées à l'obscurité pendant les 12 premières heures suivantes l'infection (Gonzalez-Lamothe *et al.*, 2012).

2.1.4. RT-PCR quantitative et semi-quantitative

L'ARN total est ensuite extrait à l'aide du kit «RNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen, Maryland, USA) selon les recommandations du fournisseur. L'ARN est traité avec de la DNase I (Promega, Madison, WI, USA) pour éliminer toute trace d'ADN. Après l'extraction, l'ARN total est quantifié à l'aide du Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, USA) à 260 nm de longueur d'onde. L'ADNc est généré à partir de 2µg d'ARN total extrait en effectuant une transcription reverse à l'aide de la Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les cibles ont été amplifiées en utilisant les amorces décrites dans le tableau 1 en annexe. La PCR quantitative (qPCR) a été réalisée en utilisant la méthode d'Eva Green conformément aux recommandations du fabricant (BioRad). Les courbes de fusion ont été déterminées en utilisant les courbes de dissociation du logiciel CFX manager pour s'assurer qu'un seul produit a été amplifié. Le système CFX96 (BioRad) de détection par PCR en temps réel a été utilisé pour détecter le niveau d'amplification. Le système est programmé pour appliquer 40 cycles composés d'une hybridation à 95°C pendant 15s suivie d'une élongation à 60°C pendant 1min. Avant le début des cycles, une étape d'initiation est enclenchée pendant 10 min à 95°C. Toutes les réactions ont été effectuées, pour chaque réplica biologique, en trois réplicas techniques et les valeurs moyennes ont été utilisées pour les analyses de quantification. La quantification relative de l'expression des gènes cibles est calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$. Brièvement, les valeurs de C_q (cycle seuil) des gènes cibles vont être normalisées grâce au gène contrôle (endogène) ($\Delta C_q = C_q \text{ cible} - C_q \text{ endogène}$) et comparées par rapport au calibrateur ($\Delta\Delta C_q = \Delta C_q \text{ échantillon} - \Delta C_q \text{ calibrateur}$). Donc, l'expression ou

quantification relative (QR) est calculée en utilisant le système de détection CFX96 (BioRad) et la formule $QR=2^{-\Delta\Delta Cq}$. Le facteur d'élongation *EFL-α* a été utilisé comme gène de référence.

Pour la quantification du miR472, l'ARN total a été isolé à partir de plantes contrôles et infectées en utilisant le TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et traité avec la RNase-free DNase I. Les petits ARNs ont été isolés à partir de l'ARN total à l'aide du kit miRVana (Invitrogen) développé pour une purification de haute qualité des miARNs de plante. Les petits ARNs sont par la suite polyadénylés avec l'ATP pour générer leur queue poly(A) uniformément. La polyadénylation est faite à l'aide de l'enzyme PAP (PolyAdenylate Polymerase). La polymérisation se fait à 37°C, pendant 20 minutes, dans un milieu réactionnel total de 20µL en utilisant le Poly (A) Tailing kit (Ambion) selon les recommandations du fournisseur. Après extraction par phénol-chloroforme et précipitation par éthanol, les ARNs sont dissous dans de l'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) et reverse transcrits avec 200 U de SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) et 0.5 µg de poly(T) adaptateur (amplification rapide d'extrémités 3' de l'ADNc [RACE] adaptateur FirstChoice® RLM-RACE kit, Ambion) selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). L'ADNc a été utilisé pour l'analyse par qPCR comme décrit ci-dessus. Le gène ribosomal 5S a été utilisé comme gène de référence comme décrit précédemment (Chen *et al.*, 2005; Shi et Chiang, 2005; Savatin *et al.*, 2011; Boccara *et al.*, 2014). Des qPCRs ont été également réalisées pour quantifier le niveau du miR472 chez le salk_087945 (*mir472*) et chez le Col-0 (WT). Les séquences des amorces du miR472 et du 5S sont rapportées dans le tableau 1 en annexe. Des RT-PCRs semi-quantitatives ont été réalisées afin de mesurer le niveau de transcription d'At5g43730 chez le salk_013860C, d'At5g47260 chez le salk_095083C, d'At5g05400 chez le salk_005464C, d'At4g27190 chez le salk_009665C, d'At4g10780 chez le salk_066132, d'At1g61310 chez le salk_125189C, d'At1g51480 chez le salk_068767C et d'At1g12290 chez le salk_012475C. Le Col-0 (WT) a été utilisé pour la comparaison. Les amorces utilisées sont décrites dans le tableau 1 en annexe.

2.1.5. Détection par hybridation sur puce des microARNs

L'analyse par puce à ADN a été effectuée en utilisant le service commercial fourni par LC Sciences. Le test commence par l'extension en 3' avec une queue poly (A) en utilisant la poly (A) polymérase des échantillons d'ARN total dont la concentration est comprise entre 4 et 8 µg. Une étiquette d'oligonucléotide a été ensuite liée avec la queue poly (A) pour permettre ensuite la coloration par fluorescence. L'hybridation a été effectuée durant la nuit sur une puce microfluidique µParaflo à l'aide d'une pompe à micro-circulation (Atactic Technologies) (Gao *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2007). Sur la puce microfluidique, chaque sonde de détection est composée d'un segment codant des nucléotides chimiquement modifiées complémentaires au microARN cible (miRBase, <http://mirbase.org>) et un segment espaceur de polyéthylène glycol permettant d'étendre le segment codant loin du substrat. Les sondes de détection ont été générées par synthèse *in situ* en utilisant la méthode chimique PGR (réactif photogénéré). Les températures de fusion pour l'hybridation ont été compensées par des modifications chimiques des sondes de détection. L'hybridation a nécessité 100 µL de tampon 6xSSPE (0,90 M NaCl, 60 mM Na₂HPO₄, 6 mM EDTA, pH 6.8) contenant 25% de formamide à 34°C. Après hybridation de l'ARN, l'étiquette conjuguée au colorant cyanine 3 (Cy3) a été distribuée à travers la puce microfluidique pour la coloration. Les images de fluorescence ont été recueillies à l'aide d'un scanner laser (GenePix 4000B, Molecular Device) et numérisées en utilisant le logiciel d'analyse d'image Array-Pro (Media Cybernetics). La version miRBase 16, avec 1053 miARNs uniques, est celle utilisée pour générer le contenu en sonde de la puce utilisée dans cette étude. Les données ont été analysées par une soustraction en un premier temps du bruit de fond et ensuite en normalisant les signaux en utilisant un filtre LOWESS (Locally-weighted Regression) (Bolstad *et al.*, 2003).

2.1.6. Cartographie du site de clivage de l'ARNm cible

50 µg d'ARN total issu de plantules surexprimant le miR472 (Boccara *et al.*, 2014) ont été ligués à l'extrémité 3' d'oligoARNs modifiés. La ligation d'un adaptateur d'ARN, la transcription reverse et la RACE 3' ont été réalisées comme décrit précédemment (Bologna *et al.*, 2009; Moriyama *et al.*, 2003). Deux oligonucléotides réverses emboîtés spécifiques du gène ont été utilisés pour la RACE 3'. Les produits de PCR ont été séparés sur gel d'agarose à 1,5% et détectés par coloration au bromure d'éthidium.

2.1.7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant la procédure GLM du logiciel statistique SAS 9.1. Les données ont été soumises au test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec * $P < 0,05$ ou avec ** $P < 0,01$ sauf si indication contraire.

2.2. Résultats

2.2.1. Dicer-Like 1 et Argonaute 1 d'*Arabidopsis* promeuvent la maladie causée par les agents pathogènes nécrotrophes

Pour répondre à l'hypothèse que les agents pathogènes pourraient utiliser des microARNs de l'hôte à leur avantage, un mutant d'*Arabidopsis* de la protéine Dicer-Like 1 (*dcl1-9*), qui n'accumule pas les microARNs, a été utilisé. Nous avons testé ce mutant avec l'agent

pathogène nécrotrophe *B. cinerea*. Des feuilles détachées à partir de plantes sauvages Landsberg (Ler) et de mutants *dcl1-9*, âgés de cinq semaines, ont été infectées avec des boutures d'agar de 3 mm contenant des hyphes en croissance active de *B. cinerea*. Ensuite, la sévérité de la maladie a été évaluée, 40 heures après l'infection, en mesurant la surface de la tache infectée tel que décrit dans Matériel et Méthodes d'El Oirdi *et al.*, 2011. Fait intéressant, nous avons trouvé que les plants *dcl1-9* déficients en microARNs sont significativement moins susceptibles que les plants sauvages (Ler) à *B. cinerea* (Figures 28 a et 28 b). La moyenne de la zone de la maladie était $14,47 \pm 1,63 \text{ mm}^2$ ($n = 30$) pour les mutants *dcl1-9* et $65,52 \pm 7,3 \text{ mm}^2$ ($n = 30$) pour les plantes sauvages (Figure 28 b). La biomasse fongique a été quantifiée dans les plantes infectées par PCR quantitative selon Dhawan *et al.*, (2009) et Lai *et al.*, (2013). Les niveaux de transcrits d'un gène constitutivement exprimé chez *B. cinerea*, l'*actine* sont corrélés avec la biomasse fongique (Dhawan *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2013). Des plants sauvages (Ler) et des mutants *dcl1-9* âgés de cinq semaines, ont été pulvérisés avec 5×10^5 spores de *B. cinerea* et des échantillons ont été récoltés, trois jours plus tard, pour l'extraction de l'ARN et l'analyse qPCR pour quantifier les transcrits de l'*actine* de *B. cinerea*. La figure 28 c montre une diminution significative de la biomasse de *B. cinerea* dans les plantes *dcl1-9* comparativement aux plantes du type sauvage après infection par *B. cinerea*. Ceci indique que la croissance de *B. cinerea* est limitée dans les plantes *dcl1-9* par rapport aux plantes Ler. Les mutants *dcl1-9* ont également été testés avec *A. brassicicola*, un agent pathogène nécrotrophe qui provoque la maladie des taches noires sur les plantes crucifères. Des feuilles détachées de plantes Ler et *dcl1-9*, âgées de cinq semaines ont été infectées avec des boutures de 3,5 mm de diamètre d'agar contenant des hyphes en croissance active d'*A. brassicicola* et la zone de la maladie a été mesurée trois jours plus tard, comme décrit dans Matériel et Méthodes. Comme le montrent les figures 28 d et 28 e, les plantes *dcl1-9* étaient moins susceptibles à *A. brassicicola*, comparativement, aux plantes sauvages. La moyenne de la zone de la maladie était de $27,53 \pm 2,42 \text{ mm}^2$ ($n = 20$) pour les mutants *dcl1-9* et de $81,72 \pm 10,71 \text{ mm}^2$ ($n = 20$) pour les plantes sauvages (Figure 28 e). Ainsi, DCL1 favorise les maladies causées par les deux agents pathogènes nécrotrophes *B. cinerea* et *A. brassicicola*. Étant cruciale pour la voie des microARNs, AGO1 a également été testée en réponse aux deux agents pathogènes

nécrotrophes, *B. cinerea* et *A. brassicicola*. Des feuilles détachées de plantes Columbia Col-0 et *ago1-27*, âgées de cinq semaines ont été infectées soit avec *B. cinerea* ou avec *A. brassicicola* comme décrit ci-dessus. Comme pour les plantes *dcl1-9*, les mutants *ago1-27* étaient moins susceptibles aux deux nécrotrophes comparativement aux plantes sauvages, ce qui suggère qu'AGO1 contribue à la maladie provoquée par *B. cinerea* (Figures 29 a et 29 b) et *A. brassicicola* (Figures 29 c et 29 d). Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que les microARNs dépendants de la voie de DCL1 et AGO1 favorisent la maladie causée par *B. cinerea* et *A. brassicicola*.

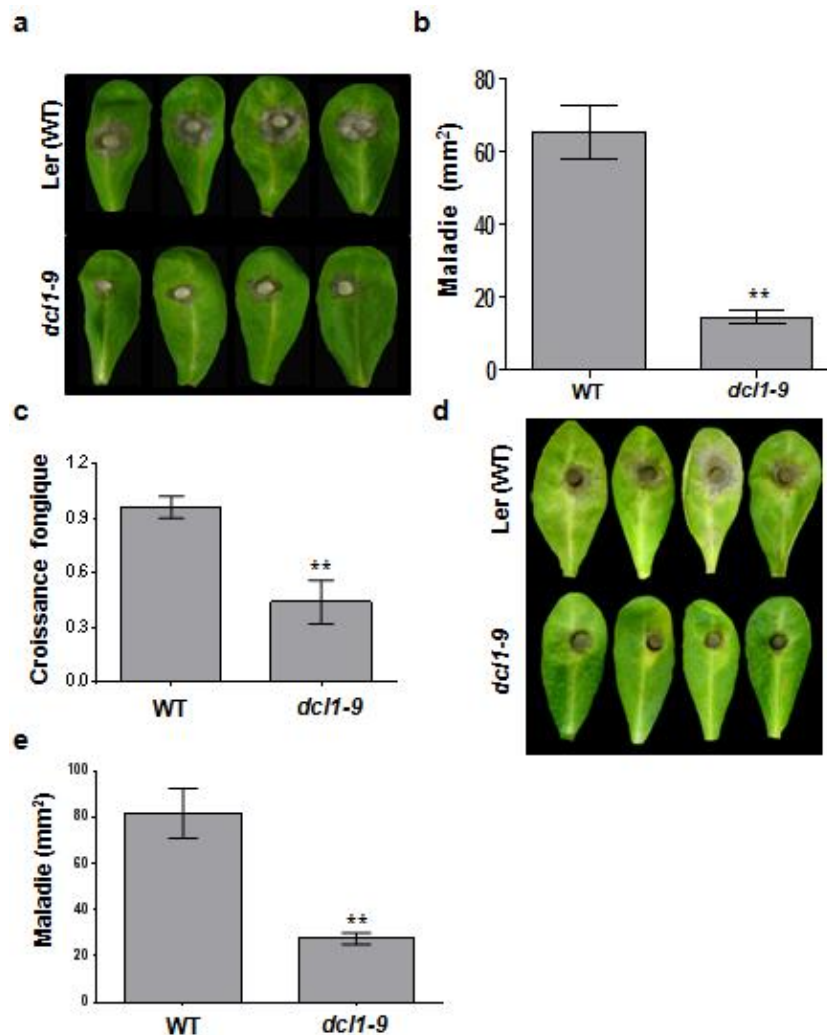


Figure 28. DCL1 contribue à la maladie causée par les agents pathogènes nécrotrophes *B. cinerea* et *A. brassicicola* chez *A. thaliana*.

(a et b) Des feuilles détachées de plantes sauvages (WT) et *dcl1-9* ont été inoculées avec *B. cinerea*. Les photos de feuilles ont été prises 40 heures après infection (a) et les zones de maladie ont été mesurées sur chaque feuille 40 heures après infection (b). Les barres d'erreur représentent les écarts-types ($n = 30$). (c) Croissance de *B. cinerea* dans les plantes inoculées. Des plantes WT et *dcl1-9* ont été pulvérisées avec 5×10^5 spores/mL de *B. cinerea* et la croissance fongique in planta a été estimée trois jours après infection en analysant le niveau des transcrits du gène *BcActine* de *B. cinerea* par RT-qPCR en utilisant le gène *AtEF1 α* comme contrôle interne. La croissance fongique relative a été corrélée au niveau des transcrits de *Bc Actine* comparé à *AtEF1- α* . Les barres d'erreur représentent les écarts-types ($n = 3$). (d et e). Des feuilles détachées de plantes sauvages (WT) et *dcl1-9* ont été inoculées avec *A. brassicicola*. Les photos de feuilles ont été prises 3 jours après infection (d) et les zones de maladie ont été mesurées sur chaque feuille 3 jours après inoculation (e). Les barres d'erreur représentent les écarts-types ($n = 20$). Les ensembles de données marqués d'astérisque(s) en b, c et e sont significativement différents des feuilles sauvages infectées comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec * $P < 0,05$ ou avec ** $P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

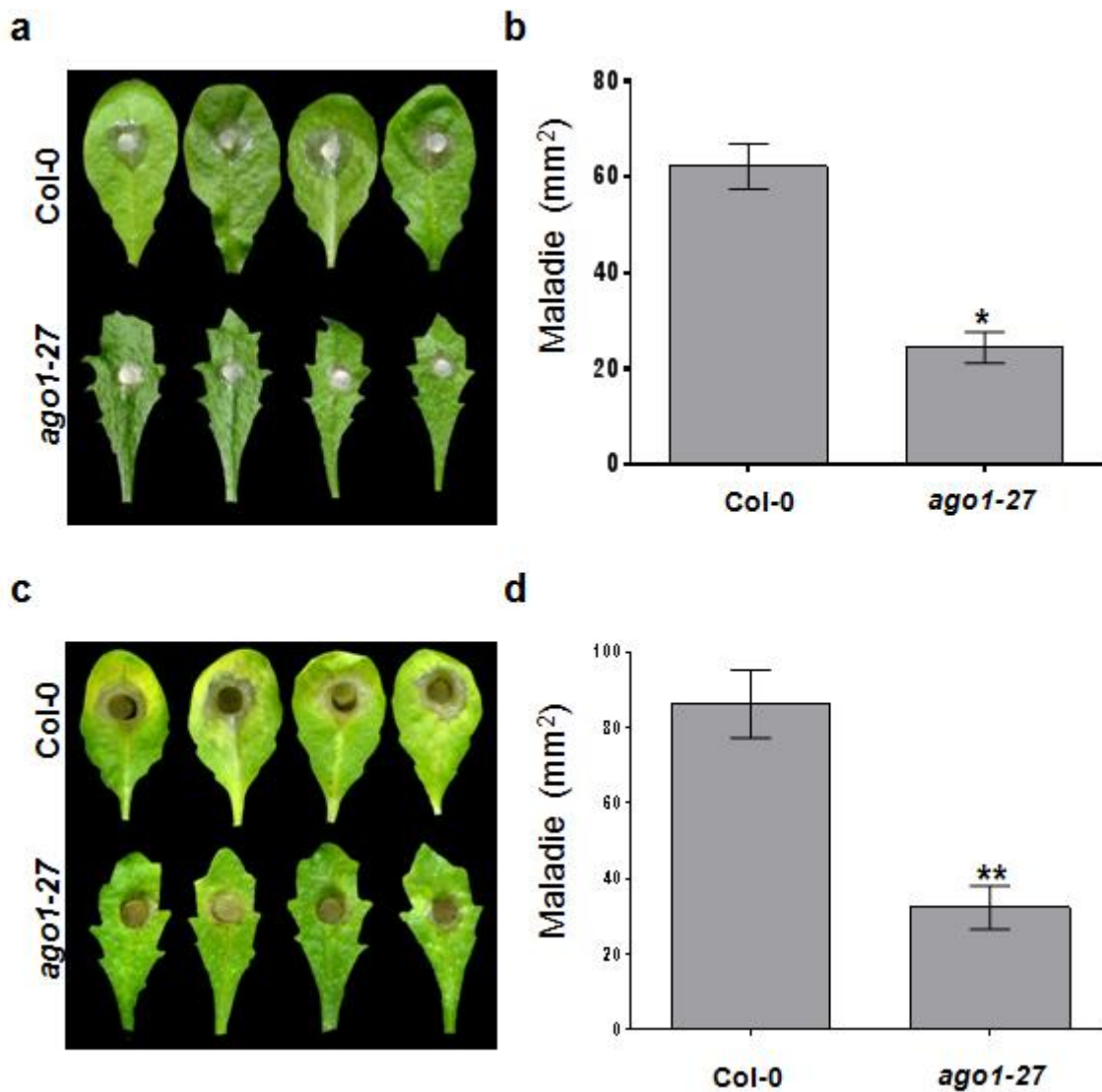


Figure 29. AGO1 favorise la maladie causée par *B. cinerea* et *A. brassicicola* chez *A. thaliana*.

(a - d) Des feuilles détachées de plantes sauvages (WT) et *ago1-27* ont été inoculées avec *B. cinerea* (a et b) ou avec *A. brassicicola* (c et d). Les photos de feuilles ont été prises 40 heures (a) et 3 jours après infection (c) et les zones de maladie ont été mesurées sur chaque feuille 40 heures (b) et 3 jours après infection (d). Les barres d'erreur en b et d représentent les écarts-types (n = 30 en b et n=20 en d). Les ensembles de données marqués d'astérisque(s) en b et d sont significativement différents des feuilles

sauvages infectées comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec* $P < 0,05$ ou avec ** $P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

2.2.2. miR472 favorise la maladie causée par les agents pathogènes nécrotrophes

Pour identifier les miARNs responsables des phénotypes ci-dessus, nous avons effectué une analyse grâce à une puce du type microarray de plantes d'*Arabidopsis* infectées avec *B. cinerea*. Des plantes âgées de cinq semaines ont été pulvérisées avec des spores de *B. cinerea* (5×10^5 spores / ml) et 12 heures après inoculation, les échantillons ont été récoltés pour l'extraction de microARN et pour l'analyse microarray comme décrit dans Matériel et Méthodes. Vingt-huit miARNs matures ont été exprimés de façon différentielle à 12 heures après inoculation par rapport à 0 heure après inoculation (figure 30 a). Parmi les miARNs induits, nous avons identifié miR472 qui a déjà été montré ciblant plusieurs transcrits codant des CC- NB-LRR (Cuperus *et al.*, 2010).

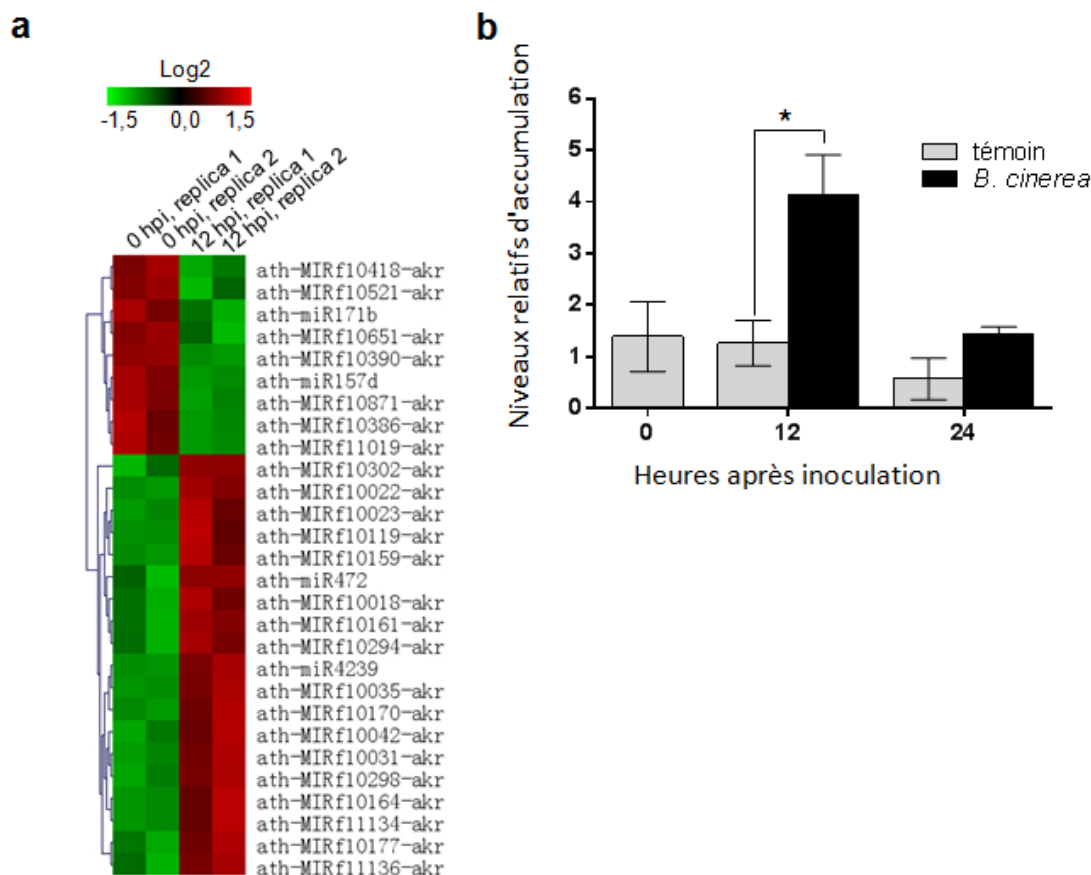


Figure 30. *B. cinerea* induit l'accumulation du miR472 chez *A. thaliana*.

(a) La carte (Heatmap) montre des changements de valeurs en log2 des miARNs régulés par *B. cinerea*. La version 16 de miRBase contenant 1053 miARNs matures est celle utilisée. Des plantes Col-0 ont été pulvérisées avec 5×10^5 spores/ml de *B. cinerea* et des échantillons ont été récoltés à 0 et 12 heures après inoculation pour l'extraction d'ARN et l'analyse par la puce comme décrit dans Matériel et Méthodes. Deux répliques biologiques ont été utilisées pour chaque point dans le temps. Chaque réplique biologique est un ensemble de cinq plantes. Les données ont été soumises à un test de Student avec $P < 0,1$. (b) Analyses qPCRs du niveau d'expression du miR472 chez les plantes infectées par *B. cinerea*. L'accumulation du miR472 a été mesurée par qPCR et normalisée grâce au gène ribosomal 5S (gène de référence). Les amorces utilisées pour les qPCRs sont décrites dans le tableau 1 en annexe. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de cinq plantes. Les ensembles de données marqués d'un astérisque sont significativement différents des plantes contrôles comme prévu par le test de Tukey à intervalle de

Student (HSD) avec * $P < 0,05$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

Pour valider ces résultats de puce, des plantes âgées de cinq semaines ont été pulvérisées avec des spores de *B. cinerea*, ensuite on a récolté les tissus pour l'extraction de l'ARN et la quantification du miR472 à 0, 12 et 24 heures après inoculation. L'analyse par qPCR a confirmé le profil obtenu par microarray et a montré que *B. cinerea* induit de manière significative l'accumulation du miR472 (quatre fois) à 12 heures après inoculation, comparativement, aux plants non infectés (Figure 30 b).

Pour étudier l'importance de miR472 dans l'interaction *A. thaliana* - *B. cinerea*, un mutant déficient en miR472 (*mir472*) a été caractérisé et infecté avec *B. cinerea* (Figure 31 et figure 1 en annexe). La surface de la maladie sur les feuilles infectées avec *B. cinerea*, a été analysée comme décrit dans Matériel et Méthodes. Fait étonnant, les plantes mutantes *mir472* étaient moins susceptibles à *B. cinerea* que les plantes sauvages (Figures 31 a et 31 b), ce qui est assez similaire à ce qu'on observe en comparant les mutants *dcl1-9* aux plantes sauvages (Figures 28 a et 28 b). La moyenne de la surface de la maladie était de $22,2 \text{ mm}^2 \pm 7,79$ ($n = 30$) pour les mutants *mir472* et de $59,07 \text{ mm}^2 \pm 7,43$ ($n = 30$) pour les plantes sauvages (Figure 31 b). Ainsi, le miR472 contribue à la susceptibilité d'*Arabidopsis* à l'égard de *B. cinerea*.

miR472 a également été testé en réponse à *A. brassicicola*. Des feuilles détachées de plantes WT et *mir472*, âgées de cinq semaines, ont été infectées avec *A. brassicicola* et les surfaces de la maladie ont été rapportées 3 jours plus tard. Comme représenté sur les figures 31 c et 31 d, les plantes *mir472* étaient significativement moins susceptibles à *A. brassicicola*, comparativement aux plantes WT. La moyenne de la superficie de la maladie était de $24,29 \text{ mm}^2 \pm 4,24$ ($n = 20$) pour les mutants *mir472* et de $78,15 \text{ mm}^2 \pm 10,09$ ($n = 20$) pour les plantes du type sauvage (Figure 31 d).

Dans l'ensemble, miR472 favorise le développement des nécrotrophes en supprimant les défenses dépendantes de l'acide jasmonique (AJ). Cette hormone végétale est un acteur majeur dans la régulation de la signalisation impliquée dans la résistance contre les nécrotrophes (Glazebrook, 2005). Pour tester si le phénotype moins susceptible qu'on observe chez les mutants *mir472* passait par l'AJ, nous avons quantifié les niveaux de défensine (*PDFI.2*), un gène de défense dépendant de la voie de l'AJ, chez des plantes sauvages WT et chez des plantes *mir472*. Le niveau d'expression de *PDFI.2* était significativement plus élevé chez les plantes *mir472* par rapport aux plantes WT (Figures 31 e). Ces résultats suggèrent que le miR472 régule négativement l'expression de défenses dépendantes de la voie de l'AJ; ce qui pourrait expliquer le phénotype de résistance observé chez les plantes *mir472* à la fois envers *B. cinerea* et *A. brassicicola*.

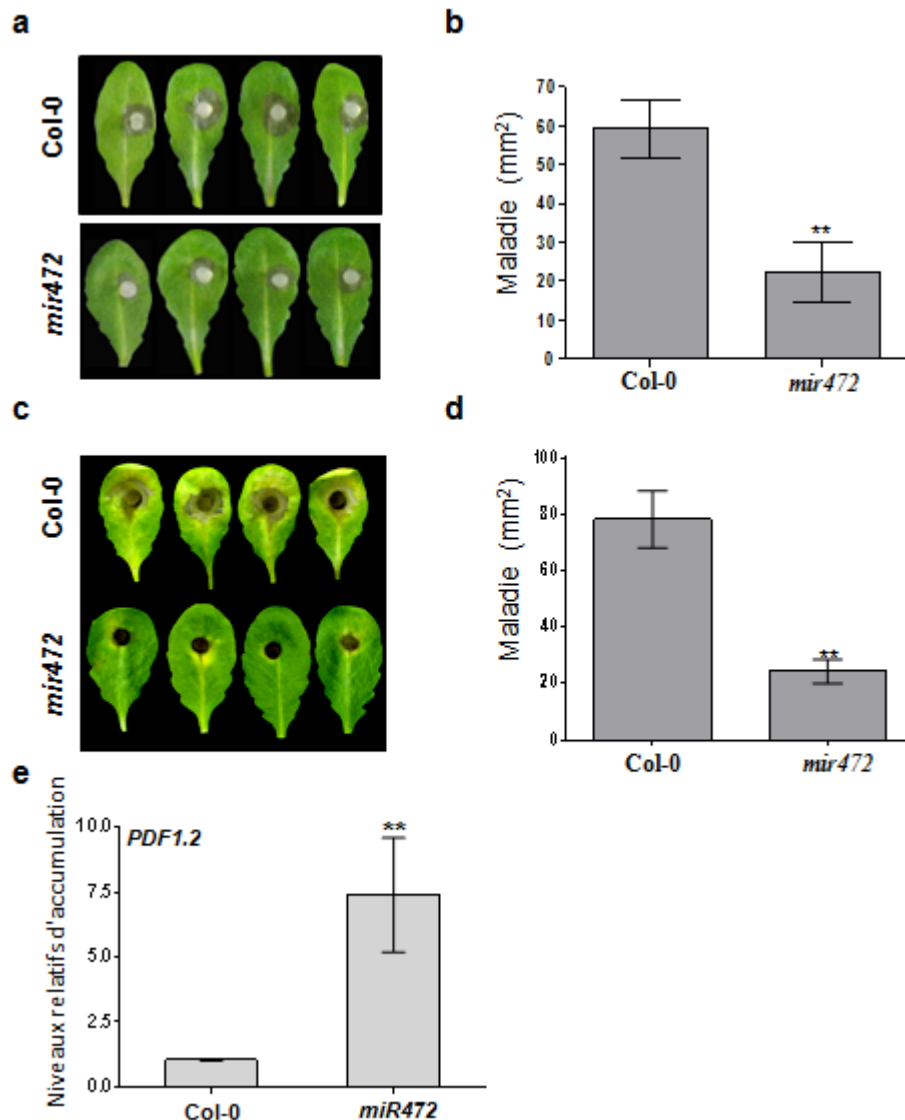


Figure 31. miR472 contribue à la maladie causée par *B. cinerea* et *A. brassicicola* chez *A. thaliana* en supprimant les défenses dépendantes de la voie de l'AJ.

(a et b) Les plantes *mir472* sont moins susceptibles à *B. cinerea* comparativement aux plantes sauvages (WT). Des feuilles détachées de plantes sauvages (WT) et *mir472* ont été inoculées avec *B. cinerea* comme décrit dans Matériel et Méthodes. Les photos de feuilles ont été prises (a) et les zones de maladie ont été mesurées sur chaque feuille 40 heures après infection (b). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n = 30). Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des feuilles sauvages infectées comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec ** P < 0,01. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec

des résultats similaires. (c et d) Les plantes *mir472* sont moins susceptibles à *A. brassicicola* comparativement aux plantes sauvages (WT). Des feuilles détachées de plantes sauvages (WT) et *mir472* ont été inoculées avec *A. brassicicola* comme décrit dans Matériel et Méthodes. Les photos de feuilles ont été prises (c) et les zones de maladie ont été mesurées sur chaque feuille 3 jours après inoculation (d). Les barres d'erreur représentent les écarts-types ($n = 20$). Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des feuilles sauvages infectées comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec $** P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (e) miR472 affecte l'expression de *PDF1.2*, marqueur de la voie de signalisation de l'acide jasmonique (AJ). Des analyses par qPCR ont été menées pour quantifier le niveau d'expression de *PDF1.2* de plantes non-infectées WT et *mir472*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des plantes sauvages au même point dans le temps comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec $** P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

2.2.3. RDR6 favorise la maladie causée par les nécrotrophes en supprimant la voie de l'AJ

Le miR472 d'*Arabidopsis* est un ARN de 22 nucléotides de long. Il a été montré que ce miR472 déclenche la biogenèse de siARNs dépendants de RDR6 à partir de transcrits NB-LRR (Cuperus *et al.*, 2010). Cela nous conduit à aborder la question de savoir si la voie d'interférence qui passe par miR472-RDR6 a un rôle dans la promotion de la maladie causée par *B. cinerea*. Des feuilles détachées de plantes âgées de cinq semaines WT et *rdr6-15* ont été infectées avec *B. cinerea* comme décrit dans Matériel et Méthodes. La surface de la maladie a été mesurée 40 heures plus tard. Comme représenté sur les figures 32 a et 32 b, les plantes *rdr6-15* étaient significativement moins susceptibles à *B. cinerea*, comparativement, aux plantes WT. La moyenne de la surface de la maladie était de $41,07 \text{ mm}^2 \pm 2,6$ ($n = 30$) pour les mutants *rdr6* et de $63,7 \text{ mm}^2 \pm 4,9$ ($n = 30$) pour les plantes du type sauvage (Figure 32 b). RDR6 a également été testé en réponse à *A. brassicicola*. Des feuilles détachées à partir de plantes WT et *rdr6-15*, âgées de cinq semaines, ont été infectées avec *A. brassicicola* comme décrit ci-dessus. La surface de la maladie a été mesurée 3 jours plus tard. Comme représenté sur les figures 32 c et 32 d, les plantes *rdr6-15* étaient significativement moins susceptibles à *A. brassicicola*, comparativement aux plantes WT. La moyenne de la surface de la maladie

était de $40,01 \text{ mm}^2 \pm 6,24$ ($n = 20$) pour les mutants *rdr6* et de $81,3 \text{ mm}^2 \pm 8,85$ ($n = 20$) pour les plantes sauvages (Figure 32 d). Fait intéressant, les plantes *rdr6-15* ont montré une accumulation accrue du niveau des transcrits de *PDF1.2* comparativement aux plantes WT (Figure 32 e). Ces résultats suggèrent que *RDR6* compromet la voie de défense dépendante de l'AJ; ce qui pourrait expliquer le phénotype de résistance observé chez les plantes *rdr6-15* à la fois envers *B. cinerea* et *A. brassicicola*.

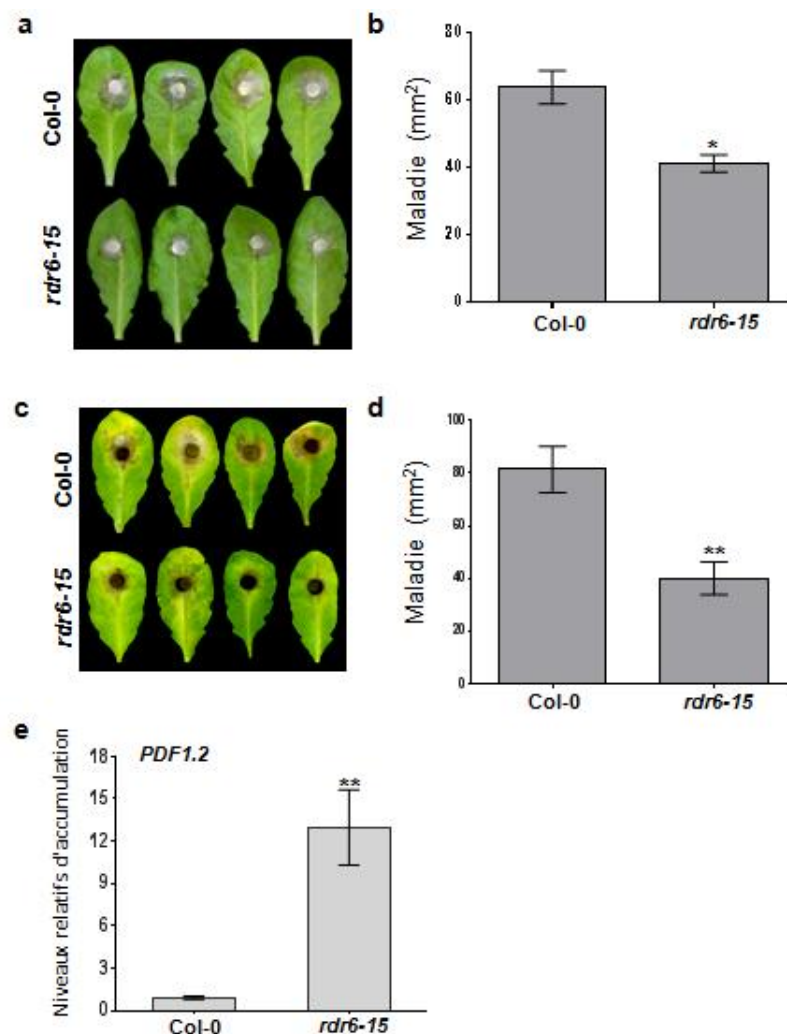


Figure 32. RDR6 favorise la maladie causée par *B. cinerea* et *A. brassicicola* chez *A. thaliana* en supprimant les défenses dépendantes de la voie de l'AJ.

(a - d) Des feuilles détachées de plantes sauvages (WT) et *rdr6-15* ont été inoculées avec *B. cinerea* (a et b) ou avec *A. brassicicola* (c et d) comme décrit dans Matériel et méthodes. Les photos de feuilles ont été prises 40 heures (a) et 3 jours après infection (c) et les zones de maladie ont été mesurées sur chaque feuille 40 heures (b) et 3 jours après infection (d). Les barres d'erreur en b et d représentent les écarts-types ($n = 30$ en b et $n=20$ en d). Les ensembles de données marqués d'astérisque(s) en b et d sont significativement différents des feuilles sauvages infectées comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec* $P < 0,05$ ou avec ** $P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (e) RDR6 régule négativement l'expression de *PDF1.2*, marqueur de la voie de signalisation de l'acide jasmonique (AJ). Des analyses par qPCR ont été menées pour quantifier le niveau d'expression de *PDF1.2* de plantes non-infectées WT et *rdr6-15*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de cinq plantes. Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des plantes sauvages au même point dans le temps comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec ** $P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

2.2.4. Le gène CC–NB–LRR : RDS1 ciblé par la voie de l'extinction à l'ARN qui passe par miR472-RDR6, contribue à la résistance contre les nécrotrophes

Plusieurs gènes codant pour des protéines CC–NB–LRR sont prédits comme cibles du miR472 (Tableau 2 en annexe) (Cuperus *et al.*, 2010; Dai et Zhao, 2011). Nous avons identifié et caractérisé huit mutants qui ont été infectés avec *B. cinerea* (Figure 2 en annexe). Nous avons trouvé que le mutant du gène At5g05400 NB-LRR (Salk_005464C) a montré la plus forte susceptibilité à *B. cinerea* comparativement au sauvage (Figures 33 a et 33 b). Nous nous référons à At5g05400 comme réducteur de la susceptibilité à la maladie 1 (*RDS1*) pour «Reduced Disease Susceptibility1» ci-dessous.

Ensuite, nous avons regardé si le marqueur de défense qui passe par la voie de l'AJ, *PDF1.2* est affecté chez les plantes mutantes *rds1* infectées avec *B. cinerea* ce qui pourrait expliquer le phénotype de susceptibilité accrue observé chez ce mutant comparativement aux plantes sauvages. Des plantes âgées de cinq semaines sauvages et *rds1* ont été infectées avec des

spores de *B. cinerea* (5×10^5 spores/ml) et des échantillons ont été prélevés à 0 et 24 heures après inoculation pour l'extraction d'ARN. L'analyse qPCR a montré que le niveau d'expression de *PDF1.2* a été significativement réduit chez les plantes infectées *rds1* comparativement aux plantes infectées sauvages (Figure 33 c).

RDS1 a également été testé en réponse à *A. brassicicola*. Des feuilles détachées à partir de plantes sauvages et de mutants *rds1* âgées de cinq semaines, ont été infectés avec *A. brassicicola* comme décrit précédemment et les surfaces d'infection ont été mesurées 3 jours plus tard. Comme représenté sur les figures 33 d et 33 e, les plantes *rds1* étaient significativement plus sensibles à *A. brassicicola* comparativement aux plantes WT. La moyenne de la surface de la maladie était de $115,30 \text{ mm}^2 \pm 19,12$ ($n = 25$) pour les mutants *rds1* et de $74,91 \text{ mm}^2 \pm 11,46$ ($n = 25$) pour les plantes sauvages (Figure 33 e). Tout comme dans le cas de *B. cinerea*, *RDS1* contribue à la résistance contre *A. brassicicola*. Dans l'ensemble, *RDS1* contribue à la réduction de la susceptibilité d'*Arabidopsis* à l'égard des deux nécrotrophes *B. cinerea* et *A. brassicicola*.

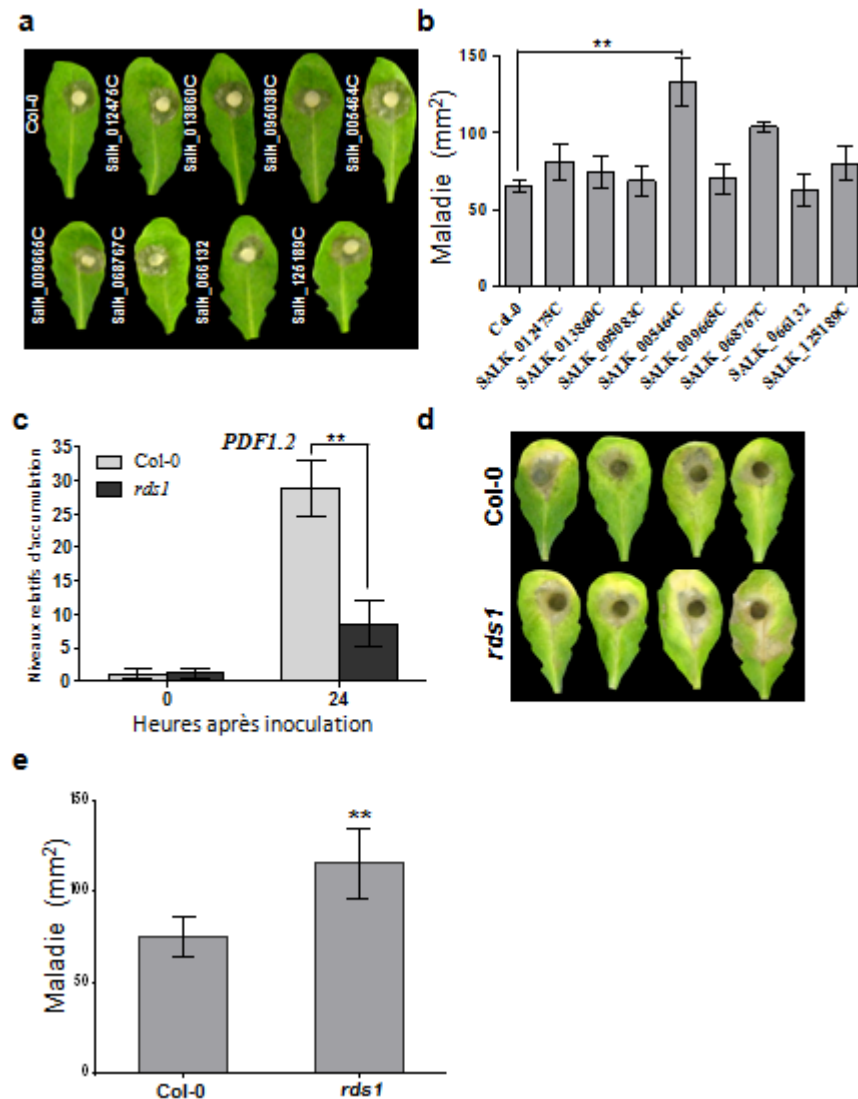


Figure 33. Une cible prédite du miR472 réduit la susceptibilité d'*A. thaliana* à *B. cinerea* et à *A. brassicicola*.

(a et b) Croissance de *B. cinerea* sur les mutants des cibles prédites du miR472. Des feuilles détachées de plantes sauvages (WT) et de mutants des cibles prédites du miR472 ont été inoculées avec *B. cinerea*. Les photos des feuilles ont été prises (a) et les zones de maladie ont été mesurées sur chaque feuille 40 heures après (b). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n = 15). Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des feuilles sauvages infectées comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec ** P < 0,01. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (c) RDS1 régule l'expression de *PDF1.2*, un marqueur de la voie de signalisation de l'acide jasmonique (AJ). Des plantes WT et *rds1* ont été pulvérisées avec 5×10^5 spores/mL de *B. cinerea* et des échantillons ont été prélevés à 0 et 24 heures après infection pour l'extraction d'ARN. Des analyses par qPCR ont été menées pour quantifier le niveau d'expression de *PDF1.2* comme décrit dans Matériel et Méthodes. Les barres d'erreur

représentent l'écart-type de trois réplicas biologiques. Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des plantes sauvages au même point dans le temps comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec ** $P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (d et e) Les plantes *rds1* sont plus susceptibles vis-à-vis d'*A. brassicicola* comparativement aux plantes sauvages. Des feuilles détachées de plantes sauvages (WT) et des mutants *rds1* ont été inoculés avec *A. brassicicola* comme décrit dans Matériel et méthodes. Les photos de feuilles ont été prises (d) et les zones de maladie ont été mesurées sur chaque feuille 3 jours après infection (e). Les barres d'erreur représentent les écarts-types ($n = 20$). Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des feuilles sauvages infectées comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec ** $P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

Le miR472 a été prédit cliver l'ARNm de *RDS1* entre les positions 544 et 565 (Figure 34 a), (Cuperus *et al.*, 2010; Dai et Zhao, 2011). Le clivage de *RDS1* par le miR472 a été expérimentalement validé par la méthode d'amplification rapide des extrémités 3' d'ADNc (RACE 3'). En raison de la taille du miR472 qui est de 22-nt, nous avons réalisé une RACE 3' au lieu d'une RACE 5' classique afin d'éviter la détection de produits de clivages générés au cours d'une possible biogenèse de siARNs secondaires à partir de l'ARNm de *RDS1* (figure 34 b). L'analyse par RACE a révélé la présence de produits de clivage (5') stables dérivés des ARNms de *RDS1* (figure 34 b). Après la PCR emboîtée, les produits de clivage (5') ont été clonés et séquencés, 19 sur 20 ont montré un clivage au niveau de la 3ème et 4ème position du miR472 à partir de l'extrémité 5' (figure 34 a). Cette position de clivage n'est pas en accord avec les paramètres généraux de reconnaissance miARN-cible. Cependant, différents rapports montrant des clivages médiés par des miARNs, montrent des positions de clivage non conventionnelles, déplacées en aval ou en amont des positions attendues (10° et 11°) comme dans le cas de *RDS1*, ont été récemment publiés (Kohli *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2006; Jagadeeswaran *et al.*, 2009; Arenas-Huertero *et al.*, 2009). En outre, il a été démontré que le miR472 régule d'autres transcrits de gènes NB-LRR (comme At1g12220, At1g51480 et At5g43730) produisant plusieurs siARNs secondaires (Boccaro *et al.*, 2014). En raison de l'homologie qui existe entre *RDS1* et ces gènes NB-LRR autour du site ciblé par le miR472 ainsi que d'autres cibles potentielles encore non validées du miR472 (comme At1g12290, At4g10780 et At1g61310), nous ne pouvons pas exclure que des siARNs secondaires provenant de ces cibles du miR472 pourraient également agir sur *RDS1* (Figure 3 en annexe).

Pour étudier cette deuxième hypothèse, nous avons quantifié les niveaux des transcrits de *RDS1* chez des plantes Col-0 (WT), *mir472* et *rdr6-15*. Les niveaux des transcrits de *RDS1* étaient significativement plus élevés chez les deux mutants *mir472* et *rdr6-15* comparativement aux plantes sauvages (Figure 34 c) renforçant ainsi l'idée que *RDS1* peut être aussi une cible des siARNs secondaires dépendants de la voie de RDR6. Il est intéressant de noter que le niveau du miR472 chez les plantes *rdr6-15* est comparable à celui observé chez les plantes WT (Boccaro *et al.*, 2014). Par conséquent, la voie de l'extinction qui passe par miR472-RDR6 cible le transcrite du NB-LRR, *RDS1* conduisant ainsi à une croissance des nécrotrophes.

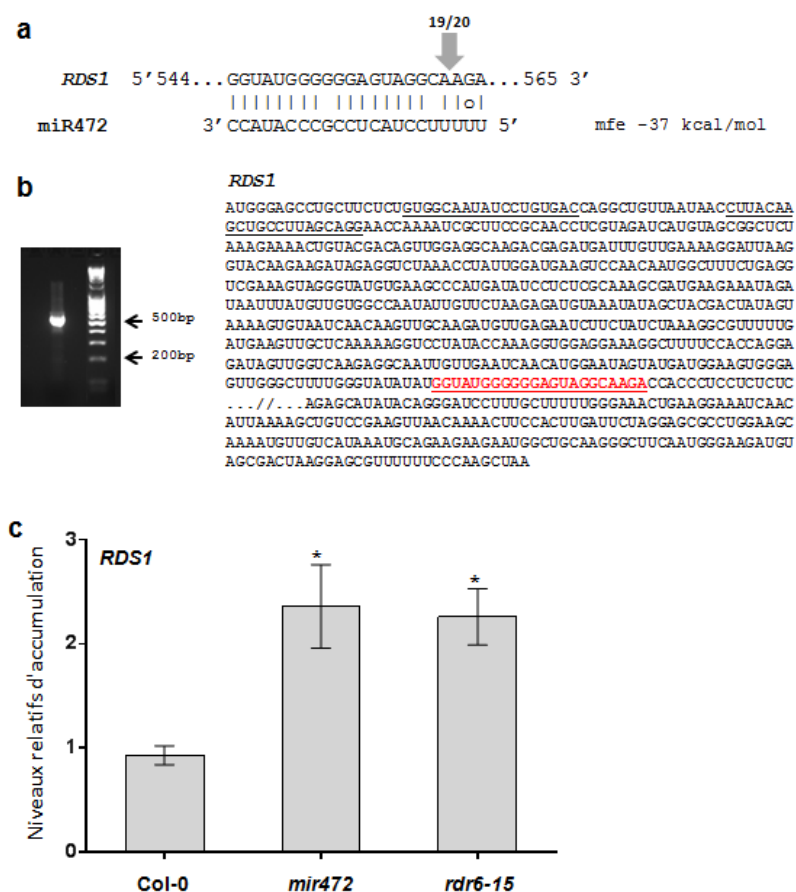


Figure 34. La CC-NB-LRR *RDS1* est une cible directe de la voie d'interférence médiée par miR472-RDR6.

(a) Alignement de séquences de l'ARNm partiel de *RDSI* avec le miR472. La flèche indique le site de clivage, et les nombres au-dessus de la flèche représentent la fréquence des clones séquencés. Les énergies libres des structures des duplexes ont été calculées en utilisant la méthode Mfold (Zuker, 2003). (b) Le gel d'agarose montre les produits de PCR nichées représentant les fragments en 5'. MM représente les marqueurs moléculaires. Séquences de l'ARNm partiel de *RDSI* obtenues à partir des clones de produits PCR montrés en a. Les nucléotides correspondant au site ciblé par le miR472 sont en rouge et soulignés. Les nucléotides correspondant aux sites de liaison des oligonucléotides internes et externes utilisés pour la PCR nichée sont soulignés. (c) Niveaux relatifs d'accumulation de l'ARNm de *RDSI* chez des plantes Col-0, *mir472* et *rdr6-15*. Des échantillons de plantes Col-0, *mir472* et *rdr6-15* ont été prélevés pour l'analyse par RT-qPCR de l'accumulation de *RDSI*. Les amorces utilisées pour les qPCRs sont décrites dans le tableau 1 en annexe. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de cinq plantes. Les ensembles de données marqués d'un astérisque sont significativement différents des plantes contrôles comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec * $P < 0,05$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

2.3. Discussion

On a montré que les petits ARNs des plantes jouent un rôle important dans la résistance basale ainsi que celle spécifique chez *Arabidopsis* contre les agents pathogènes (Navarro *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011; Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006; 2007; Ruiz-Ferrer et Voinnet, 2009; Pumplin et Voinnet, 2013; Seo *et al.*, 2013). Le siARN endogène nat-siRNAATGB2 est induit par *P. syringae* qui possède l'effecteur AvrRpt2. Ce microARN contribue à la résistance race spécifique médiée par la voie de la protéine CC–NB–LRR RPS2 en réprimant un régulateur négatif de cette voie (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). La transcription du miR393 est induite par la Flg22 pour cibler les ARNms codant la protéine TIR 1 (F-box auxin receptor Transport Inhibitor Response 1) ainsi que les ARNms des protéines reliées ce qui conduit à la répression de la signalisation de l'auxine et par conséquent, à la résistance antibactérienne (Navarro *et al.*, 2006). Récemment, Zhang *et al.* (2011) ont montré que le miR393* aussi contribue à l'immunité, principalement l'ETI, en modulant la sécrétion de PR1. L'importance du miR393 et du miR167 dans la coordination de l'interaction entre les plantes et *Agrobacterium tumefaciens* a également été décrite précédemment (Pruss *et al.*, 2008). Le séquençage en

profondeur des petits ARNs reliés à AGO1 a conduit à l'identification d'un certain nombre de miARNs qui sont régulés positivement ou négativement par la Flg22 (Li *et al.*, 2010). La surexpression de certains miRNAs dans des plantes transgéniques stables a démontré que le miR160a régule positivement le dépôt de callose induit par les PAMPs, alors que le miR398b et le miR773 régulent négativement le dépôt de callose induit par les PAMPs ainsi que la résistance aux maladies d'origines bactériennes (Li *et al.*, 2010). Les virus des plantes, les bactéries pathogènes et récemment les oomycètes pathogènes ont développé des suppresseurs de l'interférence à l'ARN qui ciblent de nombreuses étapes des voies des siARNs et des miARNs (Navarro *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010; Burgyan et Havelda, 2011; Qiao *et al.*, 2013; Pumplin et Voinnet, 2013). Fait intéressant, le suppresseur viral de l'interférence à l'ARN P19 induit l'accumulation du miR168 chez *Nicotiana benthamiana*, et ceci est associé à la répression de la traduction de l'ARNm de sa cible AGO1 ce qui conduit à la réduction de la fonction antivirale de cette protéine (Varallyay *et al.*, 2010). Récemment, Boccara *et al.* (2014) ont montré que la voie d'interférence d'*Arabidopsis* qui passe par miR472-RDR6 favorise la maladie causée par *P. syringae* DC3000 en supprimant le PTI. Ce qui suggère que les cibles de la voie du miR472-RDR6 pourraient être impliquées dans la régulation du PTI. Les preuves directes demeurent encore inconnues. La protéine de résistance RPS5 est l'une des cibles du miR472, ceci explique pourquoi la voie du miR472-RDR6 supprime l'ETI médié par RPS5. Nos résultats montrent que les principaux acteurs de la voie des miARNs DCL1 et AGO1 contribuent à la maladie causée par les agents pathogènes nécrotrophes *B. cinerea* et *A. brassicicola* chez *A. thaliana*. Nos données sont conformes aux résultats présentés chez *Arabidopsis* indiquant que DCL1 et AGO1 régulent négativement certains gènes liés à la défense (Ronemus *et al.*, 2006; Yi et Richards 2007; Kurihara *et al.*, 2009). En outre, AGO1 contribue à la maladie causée par le champignon *Verticillium dahliae* chez *A. thaliana* (Ellendorff *et al.*, 2009). Il est intéressant de remarquer que le miR472 est chargé, en partie, dans AGO1-RISC; ce qui est cohérent avec le phénotype moins susceptible observé chez les plantes déficientes AGO1 (Figure 29; Lu *et al.*, 2006; Cuperus *et al.*, 2010). Il a été également montré que DCL1 favorise la maladie tumorale provoquée par *Agrobacterium tumefaciens* comme en témoigne la forte résistance à la formation de tumeurs observées chez les plantes

dcl1-9 comparativement aux plantes WT (Dunoyer *et al.*, 2006). Les plantes *dcl1-9* sont également moins susceptibles au virus de la mosaïque nécrosée du trèfle violet (*Red clover necrotic mosaic virus*) et au virus de la frisolée du navet (*Turnip crinkle virus*) dépourvue de sa protéine d'enveloppe qui agit comme un suppresseur de l'extinction à l'ARN (Takeda *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2008). En outre, les deux ensembles DCL1 et AGO1 contribuent à la maladie provoquée par les pucerons chez *Arabidopsis* (Kettles *et al.*, 2013). Cependant, nos résultats reliés aux plantes déficientes en DCL1 sont en contradiction avec ceux publiés récemment par Weiberg *et al.*, (2013) dans lesquels ils ont montré que la souche de *B. cinerea* B5.10 est plus virulente sur les plantes *dcl1-7* comparativement aux plantes WT. Il est possible que cet écart soit dû à des différences dans les conditions de croissance, les procédures d'inoculation ou de la sévérité de la maladie entre les deux souches. Cependant, les plantes *ago1-27* sont moins susceptibles aux deux souches de *B. cinerea* (Weiberg *et al.*, 2013, Figure 29). Nos résultats indiquent que la voie de l'extinction à l'ARN qui passe par miR472-RDR6 chez *Arabidopsis*, qui régule négativement le niveau de RDS1 conduisant à la suppression des défenses dépendantes de l'AJ, favorise les maladies causées par les agents pathogènes nécrotrophes. Il a été publié que le nta-miR6019 (22-nt) et le nta-miR6020 (21-nt) guident le clivage du transcrit du récepteur N du tabac, du type TIR-NB-LRR qui confère une résistance au virus de la mosaïque du tabac (*tobacco mosaic virus*) (Li *et al.*, 2012). Cependant, les évidences de la régulation de ces microARNs par les agents pathogènes restent encore inconnues (Li *et al.*, 2012). Le miR472 a été identifié chez tous les Rosidées qui sont les membres d'un large clade de plantes à fleurs incluant les Brassicacées (e.g., *A. thaliana*) (Cuperus *et al.*, 2010). Le miR482, qui est présent chez plusieurs familles de plantes incluant les *Solanacées* mais pas les *Brassicacées*, est similaire au miR472, à deux différences près, au niveau des positions 2 et 14 dans la séquence nucléotidique (Shivaprasad *et al.*, 2012). Ce miR482 atténue l'expression de l'ARNm de la protéine NB-LRR de la tomate et l'accumulation de ce microARN est réduite chez les plantes infectées avec différents virus (virus de la frisolée du navet: «*Turnip crinkle virus*», virus de la mosaïque du concombre: «*Cucumber mosaic virus*» et virus du "rattle" du tabac: «*Tobacco rattle virus*») ainsi que la bactérie *Pst* DC3000 (Shivaprasad *et al.*, 2012). Il est possible que contrairement aux agents pathogènes décrits ci-dessus, *B. cinerea* puisse

réguler l'accumulation du miR482 conduisant ainsi à la suppression de l'immunité des plantes. Il est également possible qu'en opposition au miR482, les agents pathogènes puissent avoir développé des mécanismes pour induire l'accumulation du miR472 conduisant ainsi à la manipulation des systèmes de défense des plantes.

Les protéines NB-LRR des plantes agissent normalement en tant que récepteurs d'effecteurs d'agents pathogènes dans la réponse spécifique (ETI). Dans certains cas, les réponses de l'ETI requièrent une paire de protéines NB-LRR, mais il est difficile de savoir si ces protéines interagissent directement (Eitas et Dangl, 2010). Des évidences phylogénétiques suggèrent qu'un petit ancien sous clade de protéines CC-NB-LRR de plantes a évolué pour remplir la fonction "d'assistant de NB-LRR" ou «helper NB-LRR» pendant l'ETI (Collier *et al.*, 2011). NRC1 de la tomate («NB-LRR protein required for HR-associated cell death 1») et NRG1 du tabac («N-Required Gene 1») représentent les premiers exemples de protéines NB-LRR qui remplissent la fonction d'assistant et ce respectivement pour la protéine R Cf-4 (*Cladosporium Fulvum*-4) et N (Peart *et al.*, 2005; Gabriels *et al.*, 2007). Récemment, les protéines ADR1, des CC-NB-LRR, ont également été montrées comme acteurs en aval de certains capteurs d'effecteurs et qu'elles sont requises pour la défense basale contre certains agents pathogènes virulents (Bonardi *et al.*, 2011; Collier *et al.*, 2011). Les protéines ADR1 et toutes les cibles prédites du miR472 représentent deux sous groupes séparés de protéines CC-NB-LRR (Meyers *et al.* 2003). À l'exception de RPS2 et RPS5, aucune des protéines CC-NB-LRR du sous groupe représenté par RDS1, ne semble agir comme protéine R. Ce qui suggère qu'elles pourraient émerger en tant que protagonistes impliquées dans la signalisation en aval de la reconnaissance de l'agent pathogène (Meyers, *et al.*, 2003). Cette situation rappelle certains NLRs humains qui peuvent agir en aval de capteurs de PAMPs (Kufer et Sansonetti, 2011).

Nous rapportons ici que la CC-NB-LRR RDS1 contribue à la diminution de la susceptibilité d'*Arabidopsis* envers les nécrotrophes en régulant les défenses dépendantes de l'AJ. La capacité de RDS1 de contrôler les défenses dépendantes de l'AJ et l'infection causée par *B.*

cinerea ainsi qu'*A. brassicicola* la distingue du rôle de presque tous les gènes NB-LRR décrit jusqu'à date, ce qui est à notre connaissance, a été seulement décrit en association avec la résistance dépendante de l'acide salicylique. *RLM3*, qui est un gène TIR-NB-LRR, s'est avéré important pour la résistance contre *B. cinerea* et *A. brassicicola*; cependant, il n'est pas impliqué dans la voie de l'immunité dépendante de l'AJ (Staal *et al.*, 2008). Un autre gène NB-LRR a été récemment montré jouer un rôle important dans la résistance de la tomate contre *Fusarium oxysporum* (Ouyang *et al.*, 2014). Cependant, il est connu que l'AJ de l'hôte n'est pas lui-même un facteur déterminant dans la résistance contre *F. oxysporum* (Thatcher *et al.*, 2009). Un défi pour l'avenir serait de déterminer comment *B. cinerea* active la voie de l'extinction à l'ARN qui passe par miR472-RDR6 pour diminuer le niveau de transcription de *RDSI* que nous avons montré important pour l'activation des défenses dépendantes de l'AJ. Étant donné qu'il s'agit d'une protéine NB-LRR, il sera intéressant de vérifier si *RDSI* a également un rôle dans l'ETI ou si elle représente une nouvelle classe de protéines de signalisation. Les petits ARNs ciblant les NB-LRRs sont décrits chez plusieurs espèces, y compris les légumineuses, le soja et *Medicago truncatula*; on pourrait supposer que différents agents pathogènes peuvent avoir développé des mécanismes pour manipuler ces petits ARNs et par conséquent supprimer l'immunité et ainsi coloniser leurs hôtes (Zhai *et al.*, 2011).

CHAPITRE 3.

***PSEUDOMONAS SYRINGAE* MANIPULE LE MIR472 POUR PERMETTRE LE DÉVELOPPEMENT DE LA MALADIE**

3.1. Matériel et Méthodes

3.1.1. Modèle végétal

L'écotype Columbia-0 (Col-0) d'*A. thaliana*, a été utilisé comme modèle d'étude. Les lignées transformées par insertion d'ADN-T, *myc2-2* (SALK_083483, décrit par Boter *et al.*, 2004) et *coil-30* (SALK_035548, décrit par Yang *et al.*, 2012), nous ont été fournies par NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Center). Le reste des lignées utilisées ainsi que les conditions de croissance sont décrites dans le chapitre 2.

3.1.2. Conditions de croissance des souches bactériennes et tests d'infection

Les cultures de *P. syringae* DC3000 (souche sauvage) et DC3118 (souche *Pst* DC3000 incapable de produire la coronatine) sont maintenues et cultivées sur milieu KB (King Broth) alors que les cultures *hrcC* (souche *Pst* DC3000 dépourvue de système de sécrétion des effecteurs de type III, TTSS) sont cultivées sur milieu LB (Lysogeny Broth). Ces milieux sont additionnés des antibiotiques adéquats pour la sélection des souches (1µL/mL de milieu) comme détaillé dans le tableau 7.

Tableau 7. Antibiotiques nécessaires à la croissance des différentes souches de *P. syringae*

Souches de <i>P. syringae</i>	Antibiotiques
<i>Pst</i> DC3000	Rifampicine - Cycloheximide
<i>Pst</i> DC3118	Rifampicine - Cycloheximide - Kanamycine
<i>Pst</i> DC3000 <i>hrcC</i> ⁻	Rifampicine - Kanamycine

La mise en culture sur milieu solide se fait à 28°C et les stocks des souches sont conservés à -80°C dans du glycérol 50%. Les cultures bactériennes sont centrifugées à 2500g pendant 10 minutes et le culot bactérien est lavé deux fois et resuspendu dans 10 mL de MgCl₂ (10 mM) pour l'inoculation des plantes.

Les tests d'infection ont été effectués comme décrit précédemment (Gonzalez-Lamothe *et al.*, 2012; Katagiri *et al.*, 2002). Brièvement, des plantes âgées de cinq semaines ont été infiltrées sous vide avec *P. syringae*. Ensuite, la croissance bactérienne est suivie à 0 et 3 jours après inoculation en effectuant des dilutions en série à partir des extraits issus des disques foliaires (0.35 cm²). Chaque point dans le temps représente la moyenne de neuf disques foliaires prélevés sur trois plantes distinctes. Les disques sont broyés dans du MgCl₂. Les solutions obtenues (stock et dilutions correspondantes) sont déposées sur une boîte contenant le milieu LB-agar et les antibiotiques adéquats (Tableau.7). Les bactéries sont incubées à 28°C pendant 48 heures. Par la suite, on procède au comptage bactérien.

3.1.3. Expériences de réponses à la Flg22 et à la coronatine

L'inhibition de la croissance des plantules a été évaluée comme décrit précédemment (Zeng et He, 2010; Gonzalez-Lamothe *et al.*, 2012). Brièvement, les graines ont été poussées dans un

milieu ½ MS (Murashige et Skoog) liquide contenant 1% de sucrose, 1µM de Flg22 (Feldan BIO). Les plantules ont été pesées 10 jours après leur traitement à la Flg22 et le rapport de poids frais était calculé en divisant le poids des plantules contrôles par le poids des plantules traitées à la Flg22.

Pour l'étude de l'expression des gènes induits par la Flg22 et les traitements à la coronatine, les graines ont été poussées dans 2 mL de milieu ½ MS contenant 1% de sucrose. Les plaques dans lesquelles les graines sont poussées sont celles de 12 puits (Sigma-Aldrich, USA). Les plaques sont recouvertes, scellées et mises dans une chambre de culture (Sanyo, MLR351H) à 22°C avec une photopériode de 16 heures (16 heures de lumière/8 heures d'obscurité) pendant 9 jours. Au neuvième jour, le milieu est renouvelé et 24 heures plus tard on rajoute 1µM de Flg22 et/ou 1µM de coronatine (Sigma Aldrich). Les échantillons sont récoltés à différents temps pour les études de transcription génique. Ensuite des extractions d'ARN de ces échantillons ont été réalisées pour l'analyse par qPCR, comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes du chapitre 2. Les amorces utilisées dans ces expériences sont décrites dans le tableau 1 en annexe.

3.1.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant les logiciels statistiques Statistix 9 et GraphPad Prism6. Les données ont été soumises au test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec * $P < 0,05$ ou avec ** $P < 0,01$ sauf si indication contraire.

3.2. Résultats

3.2.1. *Pst* DC3000 induit l'accumulation du miR472

Pour pouvoir étudier la possibilité que des agents pathogènes pourraient manipuler le miR472 pour infecter la plante, nous avons choisi le modèle *A. thaliana*-*P. syringae* car le système de virulence de cette bactérie est bien documenté. En effet, ces bactéries induisent la maladie, en partie, grâce à deux systèmes bien étudiés dans la littérature. Le premier étant l'injection des protéines effectrices dans les cellules de la plante en utilisant le système de sécrétion de protéines du type III (TTSS) ou bien en produisant la phytotoxine; coronatine (COR) (Galan et Collmer, 1999; Mitchell, 1982).

Avant d'entamer notre hypothèse sur la possibilité que le miR472 soit manipulé par des agents pathogènes pour causer la maladie, il nous incombe de vérifier si le miR472 est accumulé lors de l'infection par *P. syringae* et s'il promeut la maladie causée par cette bactérie comme dans le cas de *B. cinerea* et *A. brassicicola* (voir chapitre 2). Pour tester si l'accumulation du miR472 est affectée par l'infection avec l'agent pathogène hémibiotrophe, *P. syringae* pv tomato DC3000 (*Pst* DC3000), des plantes de cinq semaines, ont été infiltrées sous vide avec *Pst* DC3000 (10^6 cfu/mL) et des échantillons ont été récoltés à 0 et 6 heures après inoculation pour l'extraction d'ARN. Ensuite des RTqPCRs ont été menées comme décrit dans Matériel et Méthodes. L'infection avec *Pst* DC3000 induit l'accumulation du miR472 deux fois plus chez les plantes infectées à 6 heures comparativement aux plantes témoins (Figure 35).

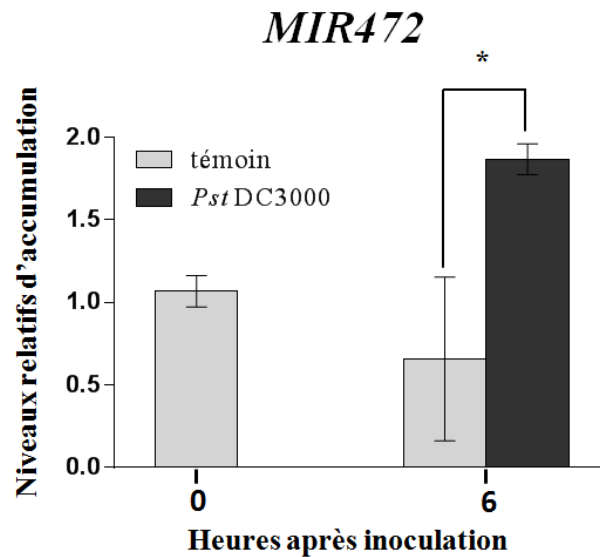


Figure 35. Accumulation du miR472 en réponse à l'infection par *Pst* DC3000.

Des plantes Col-0 ont été infiltrées avec *Pst* DC3000 et des échantillons ont été prélevés à 0 et 6 heures après inoculation pour l'analyse par RT-qPCR de l'accumulation du miR472. Des plantes infiltrées sous vide avec du $MgCl_2$ ont servies comme témoins. L'accumulation du miR472 a été mesurée par qPCR et normalisée grâce au gène ribosomal 5S (gène de référence). Les amorces utilisées pour les qPCRs sont décrites dans le tableau 1 en annexe. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois réplicas biologiques. Chaque réplica biologique contient un ensemble de cinq plantes. Les ensembles de données marqués d'un astérisque sont significativement différents des plantes contrôles comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec * $P < 0,05$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

3.2.2. miR472 contribue à la maladie causée par *Pst* DC3000 chez *A. thaliana*

Pour pouvoir utiliser ce système nous avons testé si le miR472 favorise la maladie causée par *P. syringae*. Des plantes sauvages et des mutants *mir472* ont été infiltrés sous vide avec 10 mM de $MgCl_2$ contenant 10^6 cfu/mL de *Pst* DC3000. Des disques foliaires ont été récoltés à partir des plantes infectées avec *Pst* DC3000 pour la quantification bactérienne à 0 et 3 jours

après inoculation comme décrit dans Matériel et Méthodes. Les mutants *mir472* inoculés avaient considérablement moins de symptômes que les plantes sauvages. (Figure 36 a). Les plants *mir472* infectés ont montré une croissance bactérienne significativement, moins importante comparativement aux plants sauvages infectés (Figure 36 b). Ainsi, *miR472* contribue à la susceptibilité d'*Arabidopsis* envers *Pst* DC3000. La phytohormone acide salicylique (AS) joue un rôle majeur dans la signalisation permettant la mise en place de la réponse basale et de la réponse hautement spécifique (Bari et Jones, 2009; Glazebrook, 2005; Mengiste, 2012). Pour tester si la résistance observée chez les plantes *mir472* est médiée par la voie de l'AS (voie requise pour la résistance contre les agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes), nous avons regardé si l'expression des marqueurs de cette voie *PR1* et *PR5* est affectée lors de l'infection avec *Pst* DC3000 chez les mutants *mir472*. Les plantes Col-0 et *mir472* ont été infiltrées sous vide avec *Pst* DC3000. Des échantillons ont été récoltés à 0 et 24 heures après inoculation pour l'extraction d'ARN. L'analyse par qPCR a été effectuée pour quantifier le niveau d'expression de *PR1* et *PR5*. Les analyses RTqPCR montrent que les niveaux d'expression de ces deux gènes ont significativement augmentés chez les mutants *mir472* infectés comparativement aux plantes sauvages infectées (Figure 36 c et d). Ces résultats suggèrent que *miR472* augmente la susceptibilité d'*A. thaliana* envers *Pst* DC3000 en régulant négativement la réponse immune médiée par l'AS. Ensuite, nous avons regardé si *miR472* supprimait les réponses connues induites par le PTI, ce qui expliquerait le phénotype de résistance observé chez le mutant *mir472*. Les PAMPs, y compris la flagelline (Flg22), peuvent inhiber la croissance des plantules et cette réponse est souvent utilisée comme marqueur de la réponse basale (Gonzalez-Lamothe *et al.*, 2012; Zeng et He, 2010). Après 10 jours de traitement, l'effet inhibiteur de la Flg22 sur la croissance des plantules est significativement plus important sur les mutants *mir472* comparativement aux plantules sauvages (Figure 36 e). Les analyses par RTqPCR montrent que les niveaux des transcrits de *FRK1* et *WRKY29*, des marqueurs connus du PTI, ont significativement augmentés 3 heures après traitement chez les plantules *mir472* traitées comparativement à celles sauvages traitées (Figure 36 f et g). Ces résultats suggèrent que *miR472* régule négativement l'expression des marqueurs induits par la Flg22. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que *miR472* agit comme régulateur négatif de la réponse immune basale et du PTI activé par la Flg22, ce qui

explique le phénotype de résistance observée chez les mutants *mir472*. Par ailleurs, une partie des résultats de cette figure est confirmée par un groupe français (Boccaro *et al.*, 2014). Étant donné que le miR472 est impliqué dans la virulence de *P. syringae*, on peut se poser la question si cette bactérie manipule ce microARN pour instaurer la maladie.

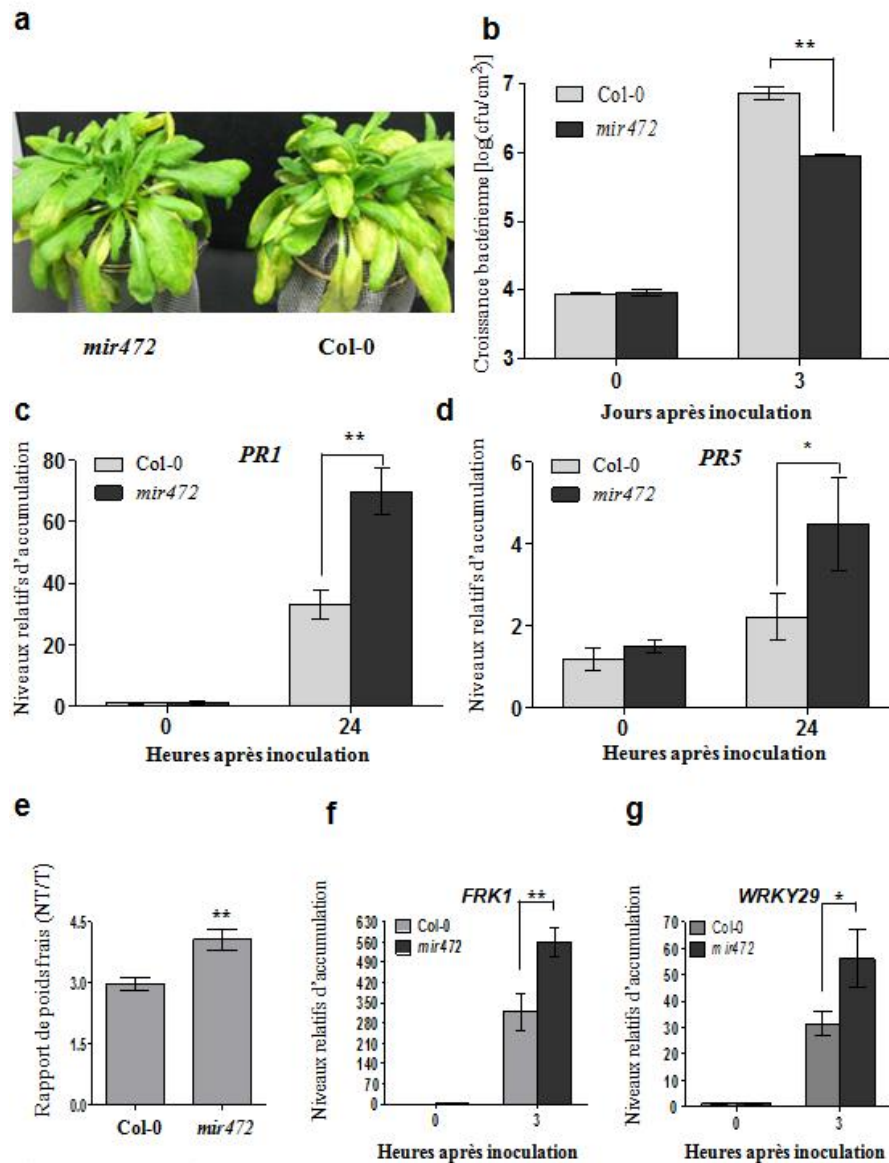


Figure 36. miR472 affecte la résistance basale activée par *Pst* DC3000 chez *A. thaliana*.

(a et b) Croissance et symptômes de *Pst* DC3000 infectant des plantes Col-0 (WT) et des plantes *mir472*. Des plantes âgées de cinq semaines ont été infiltrées sous vide avec une solution contenant 10 mM de MgCl₂ et 10⁶ cfu/mL de *Pst* DC3000. (a) Les photos présentent les symptômes se déclarant 3 jours après inoculation et des disques de feuilles ont été récoltés pour la quantification des bactéries à 0 et 3 jours après infiltration sous vide, comme décrit dans Matériel et Méthodes. (b). Les bactéries ont été récupérées à partir des disques de feuilles et la croissance déterminée en cfu/cm² de tissu foliaire. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=9). Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des plantes sauvages comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec ** P < 0,01. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (c et d) Des plantes Col-0 et *mir472* ont été infiltrées sous vide avec *Pst* DC3000 comme décrit dans Matériel et Méthodes. Des échantillons ont été prélevés à 0 et 24 heures après infection pour l'extraction d'ARN comme décrit dans Matériel et Méthodes. Des analyses qPCRs ont été menées pour quantifier le niveau d'expression de *PR1* (c) et *PR5* (d), marqueurs de la voie de l'AS. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de cinq plantes. Les ensembles de données marqués d'astérisque(s) sont significativement différents des plantes sauvages au même point dans le temps comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec * P < 0,05 ou avec ** P < 0,01. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (e, f et g) *miR472* affecte le PTI induit par la Flg22. (e) La Moyenne du rapport du poids frais des plantules Col-0 et *mir472* cultivées dans un milieu ½ MS complété avec de l'eau (non traitée, NT) ou avec 1 µM de Flg22 (traitée, T) pendant 10 jours. Les Moyennes et les écarts types ont été calculés à partir d'environ 24 plantules (6 ensembles aléatoires de 4 plantules). Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (f et g) *miR472* régule négativement l'expression de *FRK1* et *WRKY29*, deux gènes marqueurs induits par la Flg22. Des graines Col-0 et *mir472* ont été cultivées dans un milieu ½ MS et 9 jours plus tard, le milieu a été changé. 24 heures plus tard, on a traité les plantules avec 1 µM de Flg22. Des échantillons ont été prélevés à 0 et 3 heures après le traitement pour l'extraction de l'ARN comme décrit dans Matériel et Méthodes. Des analyses qPCRs ont été menées pour voir le niveau d'expression des marqueurs induits par la Flg22, *FRK1* (f) et *WRKY29* (g). Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de dix plantules. Les ensembles de données marqués d'astérisque(s) sont significativement différents des plantes sauvages au même point dans le temps comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec * P < 0,05 ou avec ** P < 0,01. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

3.2.3. *RDS1* réduit la susceptibilité d'*A. thaliana* à *Pst* DC3000

Nous avons montré que le mutant NB-LRR AT5G05400, qui est une des cibles du *miR472*, présente un phénotype de susceptibilité accrue envers *B. cinerea* et *A. brassicicola*

comparativement au plant sauvage (Figure 33 chapitre 2). Pour voir si *RDS1* est impliqué dans la susceptibilité d'*A. thaliana* à *Pst* DC3000, des plantes sauvages et des mutants *rds1* ont été infiltrés sous vide avec 10 mM MgCl₂ contenant 10⁶ cfu/mL de *Pst* DC3000. Trois jours après inoculation, tandis que les plantes sauvages inoculées montraient une chlorose, les mutants *rds1* inoculés avaient l'aspect trempé et considérablement nécrosé. Il s'agit là, de symptômes typiques du stade avancé de la maladie causée par *Pst* DC3000 (Figure 37 a; Katagiri *et al.*, 2002). Les plantes *rds1* infectées ont montré une croissance bactérienne plus importante, comparativement, aux plants sauvages infectés 3 jours après inoculation (Figure 37 b). Ainsi, *RDS1* contribue à une moindre susceptibilité d'*A. thaliana* envers *Pst* DC3000.

Nous avons regardé si l'expression des marqueurs de la voie de l'AS, *PR1* et *PR5* est affectée lors de l'infection avec *Pst* DC3000 chez les mutants *rds1*. Les plantes Col-0 et *rds1* ont été infiltrées sous vide avec *Pst* DC3000. Des échantillons ont été récoltés à 0 et 24 heures après inoculation pour l'extraction d'ARN. Les analyses RTqPCRs montrent que les niveaux d'expression de ces deux gènes sont significativement réduits chez les mutants infectés comparativement aux plantes sauvages infectées (Figure 37 c et d). Ces résultats suggèrent que *RDS1* contribue à la réponse immune médiée par l'AS.

Ensuite, nous avons investigué si *RDS1* contribue à l'efficacité du PTI induit par la Flg22, ce qui expliquerait cette susceptibilité accrue observée chez les mutants *rds1*. L'effet inhibiteur de la Flg22 sur la croissance des plantules est significativement réduit chez les plantules *rds1* comparativement à celles sauvages (Figure 37 e). Les analyses par RTqPCR montrent que les niveaux des transcrits des marqueurs induits par la Flg22, à savoir, *FRK1* et *WRKY29*, sont significativement réduits chez les plantules *rds1* traitées, comparativement à celles sauvages traitées (Figure 37 f et g). Dans l'ensemble, nos résultats montrent que *RDS1* agit comme un régulateur positif de la réponse immune basale et du PTI activé par la Flg22, ce qui expliquerait le phénotype de susceptibilité accrue observée chez les mutants *rds1*.

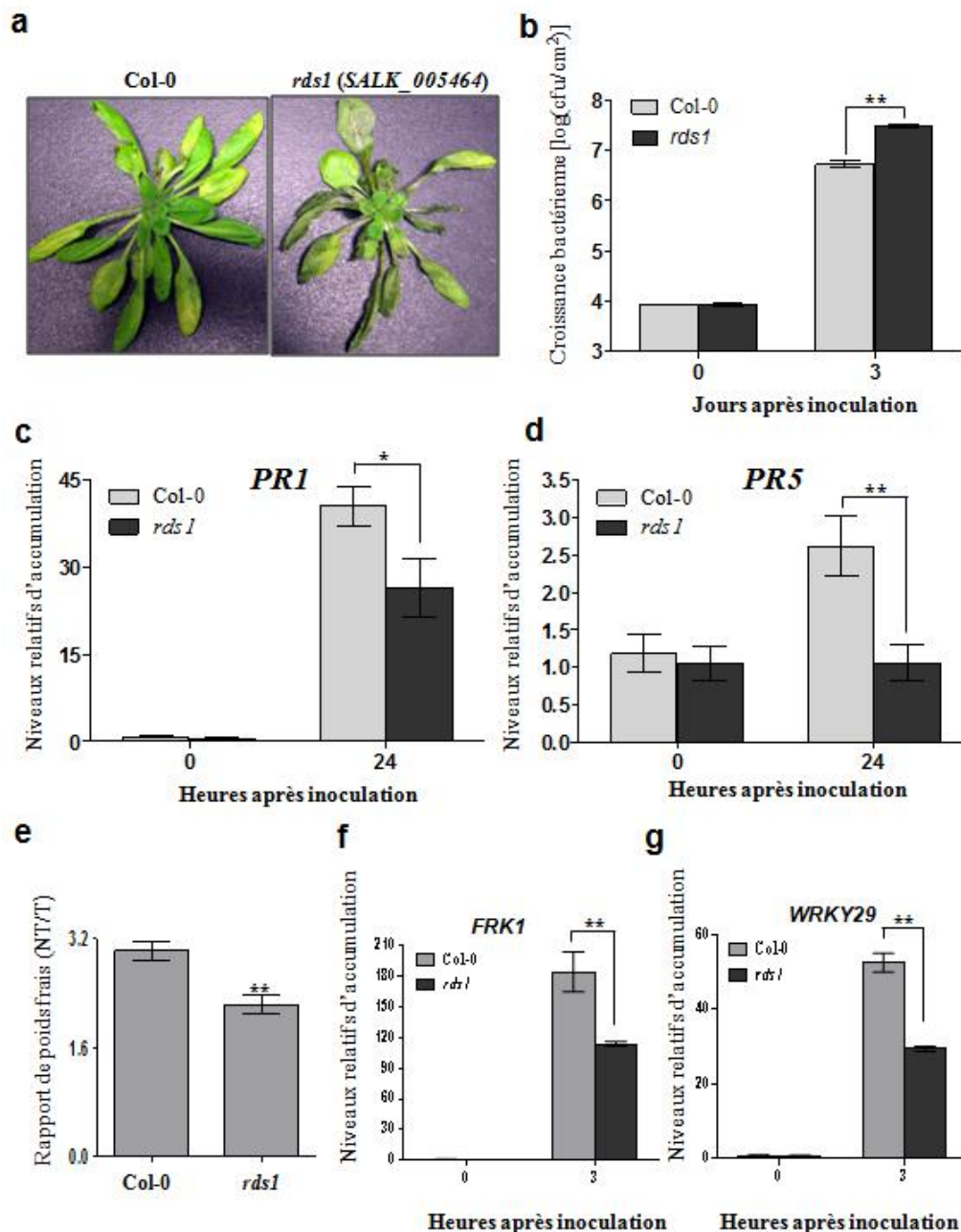


Figure 37. *RDS1* contribue à la résistance basale induite par *Pst* DC3000 chez *A. thaliana*.

(a et b) Croissance et symptômes de *Pst* DC3000 infectant des plantes Col-0 (WT) et des plantes *rds1*. Des plantes âgées de cinq semaines ont été infiltrées sous vide avec une solution de 10 mM de MgCl₂ contenant 10⁶ cfu/mL de *Pst* DC3000. (a) Les photos présentent les symptômes se déclarant 3 jours

après inoculation. (b) Des disques de feuilles ont été récoltés pour la quantification des bactéries à 0 et 3 jours après infiltration sous vide, comme décrit dans Matériel et Méthodes. Les bactéries ont été récupérées à partir des disques de feuilles et la croissance déterminée en cfu/cm² de tissu foliaire. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n = 9). Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des plantes sauvages comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec ** P < 0,01. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (c et d) Des plantes Col-0 et *rdsl* ont été infiltrées sous vide avec *Pst* DC3000 comme décrit dans Matériel et Méthodes. Des échantillons ont été prélevés à 0 et 24 heures après inoculation pour l'extraction d'ARN comme décrit dans Matériel et Méthodes. Des analyses qPCR ont été menées pour quantifier le niveau d'expression de *PR1* (c) et *PR5* (d), marqueurs de la voie de l'AS. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de cinq plantes. Les ensembles de données marqués d'astérisque(s) sont significativement différents des plantes sauvages au même point dans le temps comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec * P < 0,05 ou avec ** P < 0,01. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (e, f et g) *RDS1* contribue à l'efficacité du PTI induit par la Flg22. (e) La moyenne du rapport de poids frais des plantules Col-0 et *rdsl* cultivées dans un milieu ½ MS complété avec de l'eau (non traitée, NT) ou avec 1 µM de Flg22 (traitée, T) pendant 10 jours. Les moyennes et les écarts types ont été calculés à partir d'environ 24 plantules (6 ensembles aléatoires de 4 plantules). Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (e et f) *RDS1* régule positivement l'expression de *FRK1* et *WRKY29*, deux gènes marqueurs induits par la Flg22. Des graines Col-0 et *rdsl* ont été cultivées dans un milieu ½ MS et 9 jours plus tard, le milieu a été changé. 24 heures plus tard on a traité les plantules avec 1 µM de Flg22. Des échantillons ont été prélevés à 0 et 3 heures après le traitement pour l'extraction d'ARN comme décrit dans Matériel et Méthodes. Des analyses qPCRs ont été menées pour voir le niveau d'expression des marqueurs induits par la Flg22, *FRK1* (e) et *WRKY29* (f). Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de dix plantules. Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des plantes sauvages au même point dans le temps comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec ** P < 0,01. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

3.2.4. La coronatine est responsable de l'accumulation du miR472 chez *A. thaliana* en réponse à l'infection par *Pst* DC3000

Nous avons montré que le miR472 d'*Arabidopsis* favorise le développement de la maladie causée par *P. syringae* et que sa cible RDS1 contribue à la résistance. La question qu'on se

pose est la suivante; est-ce que *P. syringae* est capable de manipuler le miR472 pour réguler négativement l'accumulation de RDS1 et favoriser ainsi l'infection? Pour répondre à cette question, nous disposons de mutants de *P. syringae* dont les principales voies de virulence sont compromises, à savoir *Pst* DC3000 *hrcC*⁻ (souche *Pst* DC3000 dépourvue de système de sécrétion des effecteurs du type III, TTSS) et DC3118 (souche *Pst* DC3000 incapable de produire la coronatine).

En un premier temps, on a infiltré deux groupes de plantes Col-0, l'un avec la souche sauvage de *Pst* DC3000 et l'autre avec *Pst* DC3000 *hrcC*⁻. Ensuite on a procédé à l'analyse qPCR des niveaux d'accumulation du miR472 chez ces plantes (Figure 38 a). Six heures après l'infiltration, la quantification n'a révélé aucune différence significative entre les niveaux du miR472 chez les plantes Col-0 infiltrées avec la souche sauvage et le mutant *Pst* DC3000 *hrcC*⁻ (figure 38 a). Ce résultat montre clairement que la voie de virulence de *P. syringae* qui passe par l'injection des effecteurs n'est pas celle responsable de l'accumulation du miR472. Par conséquent, les effecteurs de la bactérie ne seraient pas responsables de la régulation du niveau de miR472.

En un second temps, deux groupes de Col-0 sont infiltrés, le premier avec la souche sauvage de *Pst* DC3000 et le second avec *Pst* DC3118. La quantification du miR472 après 6 heures est présentée dans la figure 38 b. Les niveaux quantifiés démontrent une baisse significative du niveau du miR472 chez les plantes Col-0 infiltrées avec *Pst* DC3118 en comparaison avec les plants inoculés avec *Pst* DC3000. Ces données signifient clairement que c'est la voie de virulence de *P. syringae* qui passe par la coronatine qui est responsable de l'activation du miR472 car le mutant qui n'accumule pas cette phytotoxine est incapable d'activer ce microARN.

Pour confirmer que c'est bien la COR qui est responsable de l'accumulation du miR472, une expérience a été menée sur des plantules Col-0. Ces dernières ont été traitées avec de la COR pure concentrée à 1µM. Des plantes témoins ont été incluses dans l'expérience. Après 15 minutes, les plantules ont été prélevées pour quantifier le miR472 par qPCR. Les niveaux obtenus sont représentés dans la figure 38 c. Cette quantification a révélé un niveau d'expression du miR472 significativement plus important chez les plantules traitées comparativement à celles témoins 15 minutes après traitement à la COR (Figure 38 c). Ce qui signifie que la coronatine pure, à elle seule, est suffisante pour induire l'accumulation du miR472.

Ensuite, des plantes Col-0 et *coil-30* ont été infiltrées avec 10 µM de COR. La quantification du miR472 après 15 minutes est présentée dans la figure 38 d. Les niveaux quantifiés démontrent une baisse significative du niveau du miR472 chez les *coil-30* infiltrés avec la COR en comparaison avec les Col-0. Ces données signifient clairement qu'en absence du récepteur COI1 de la COR, cette phytotoxine n'induit pas l'accumulation du miR472.

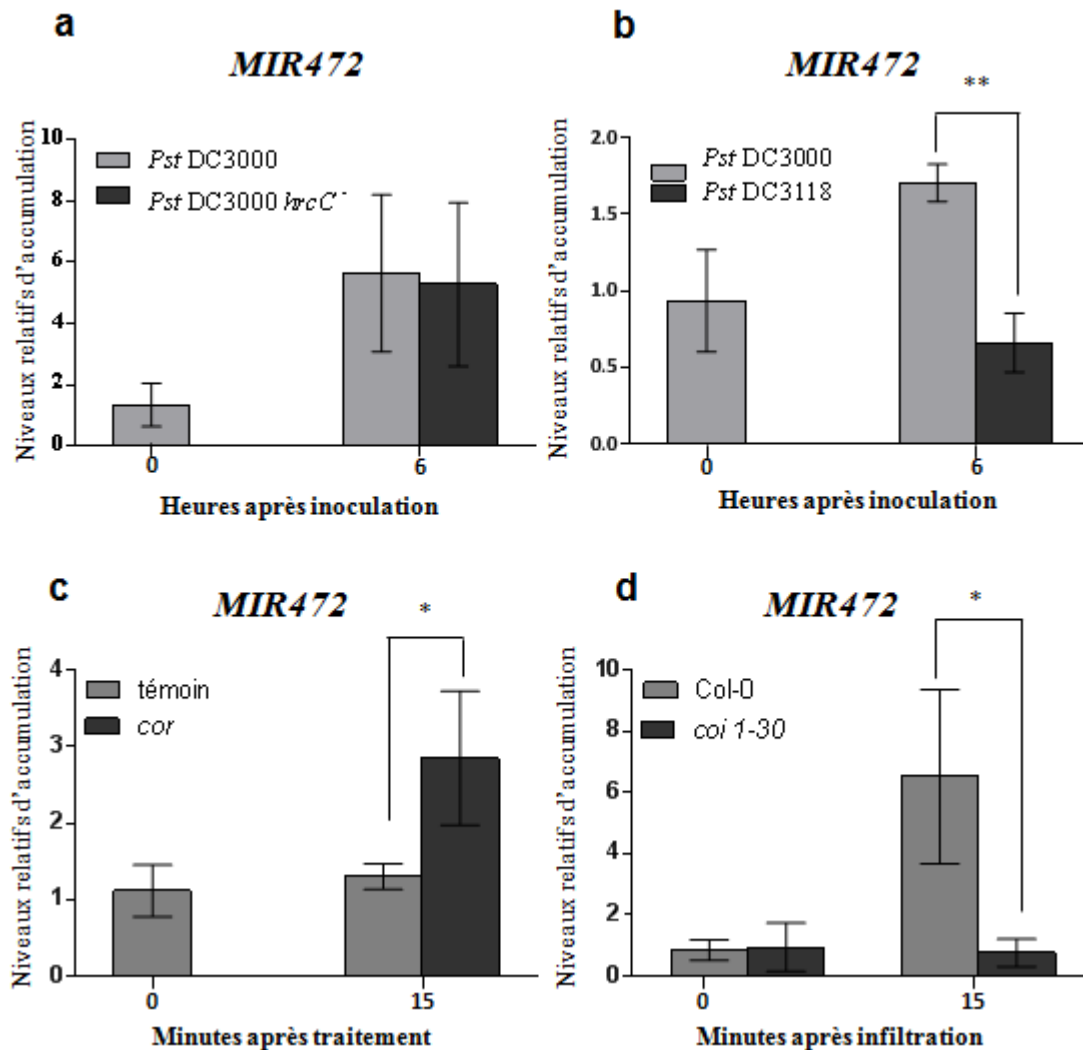


Figure 38. Accumulation du miR472 en réponse à la coronatine.

(a et b) Des plantes Col-0 ont été infiltrées sous vide avec 10^6 cfu/mL de *Pst* DC3000 vs *Pst* DC3000 *hrcC*⁻ (a) ou vs *Pst* DC3118 (b). Des échantillons ont été prélevés à 0 et 6 heures après inoculation pour l'analyse par RT-qPCR de l'accumulation du miR472. Le gène de référence pour la normalisation de la qPCR est le gène ribosomal 5S. Les amorces utilisées pour les qPCRs sont décrites dans le tableau 1 en annexe. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de cinq plantes. Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des plantes infiltrées avec les bactéries sauvages comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec ** $P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (c) Des graines Col-0 ont été cultivées dans un milieu $\frac{1}{2}$ MS et 9 jours plus tard, le milieu a été changé. 24 heures plus tard, on a traité les plantules avec 1 μ M de COR. Des échantillons ont été prélevés à 0 et 15 minutes après le traitement pour l'extraction de l'ARN

comme décrit dans Matériel et Méthodes. Des analyses qPCRs ont été menées pour voir le niveau d'expression du *MIR472*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois réplicas biologiques. Chaque réplica biologique contient un ensemble de dix plantes. Les ensembles de données marqués d'un astérisque sont significativement différents des plantes contrôles au même point dans le temps comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec * $P < 0,05$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (d) Des plantes Col-0 et *coil-30* ont été infiltrées avec 10 μ M de COR. Des échantillons ont été prélevés à 0 et 15 minutes après infiltration pour l'analyse par RT-qPCR de l'accumulation du *miR472*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois réplicas biologiques. Chaque réplica biologique contient un ensemble de cinq plantes. Les ensembles de données marqués d'un astérisque sont significativement différents des plantes sauvages comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec * $P < 0,05$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

3.2.5. *Pst* DC3000 utilise la coronatine pour inhiber l'expression de *RDSI*

En parallèle à l'étude de l'induction du *miR472*, on a aussi étudié l'effet de la coronatine sur l'accumulation du transcrit de sa cible *RDSI*. En un premier temps, deux groupes de Col-0 ont été infiltrés, le premier avec *Pst* DC3000 et le second avec *Pst* DC3118. La quantification des transcrits de *RDSI* après 6 heures est présentée dans la figure 39 a. Les niveaux quantifiés démontrent une baisse significative du niveau de *RDSI* chez les plantes Col-0 infiltrées avec *Pst* DC3000 par rapport à celles infiltrées avec *Pst* DC3118, ce qui signifie que *P. syringae* inhibe l'expression de *RDSI* via la COR. Néanmoins, pour confirmer ce résultat, on a regardé l'accumulation du transcrit de *RDSI*, lors d'un traitement à la COR. En effet, une expérience a été menée sur des plantules Col-0. Ces dernières ont été traitées avec de la COR (1 μ M) et des plantes témoins ont été aussi incluses dans l'expérience. Après 15 minutes, les plantules ont été prélevées pour quantifier l'ARNm de *RDSI* par qPCR (figure 39 b). La quantification du niveau d'expression de *RDSI*, 15 minutes après le traitement, a révélé une différence significative entre les plantules traitées à la COR et les contrôles. En effet, le transcrit de *RDSI* s'accumule significativement moins chez les plantules traitées à la COR comparativement aux plantules témoins. Ces résultats nous indiquent que la coronatine pure, à elle seule, est responsable de l'inhibition de l'expression de *RDSI*.

Ensuite, des plantes Col-0 et *coi1-30* ont été infiltrées avec 10 μ M de COR. La quantification de RDS1 après 15 minutes est présentée dans la figure 39 c. Les niveaux quantifiés démontrent une augmentation significative du niveau de RDS1 chez les *coi1-30* infiltrés avec COR en comparaison avec les Col-0. Ces données signifient clairement qu'en absence du récepteur COI1 de la COR, cette phytotoxine n'inhibe pas l'accumulation de RDS1.

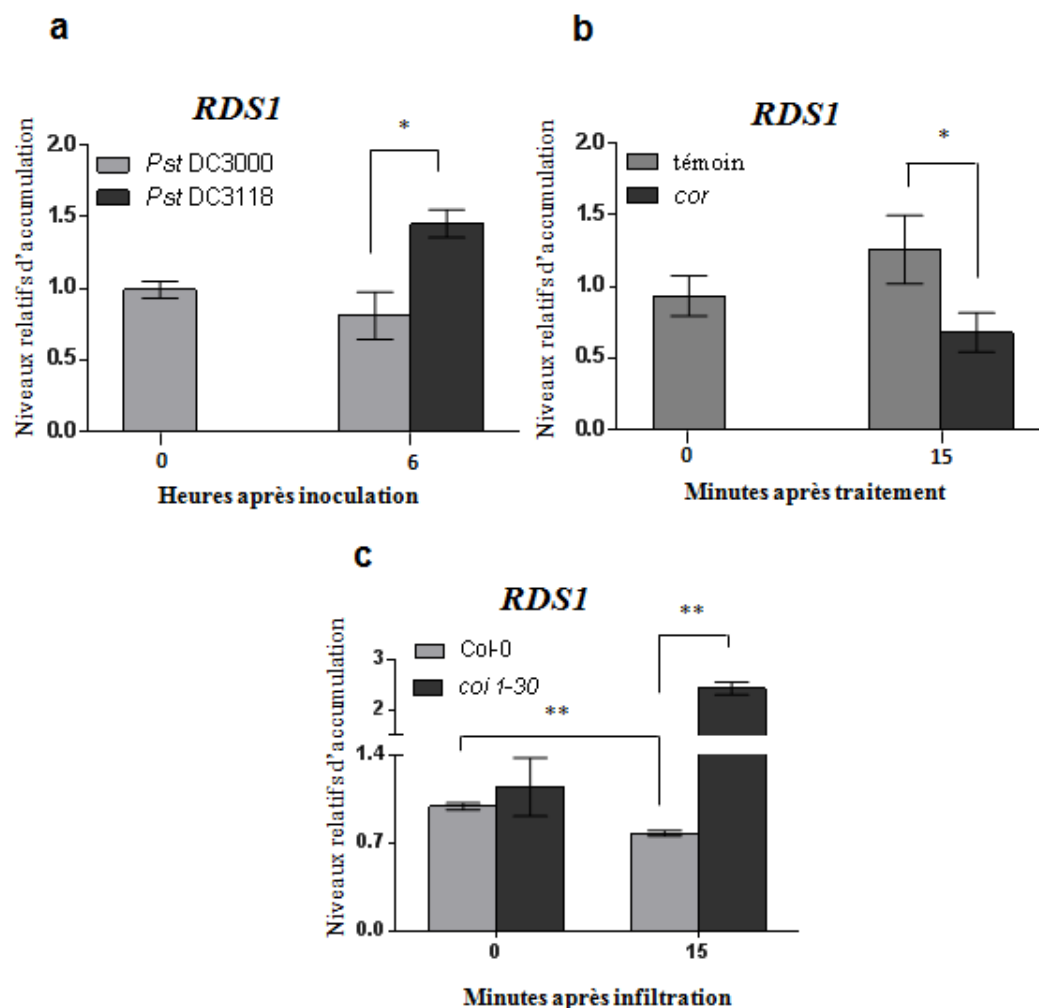


Figure 39. La coronatine régule négativement l'accumulation de *RDS1*.

(a) Des plantes Col-0 ont été infiltrées sous vide avec 10⁶ cfu/mL de *Pst* DC3000 vs *Pst* DC3118. Des échantillons ont été prélevés à 0 et 6 heures après inoculation pour l'analyse par RT-qPCR de l'accumulation de *RDS1*. Les amorces utilisées pour les qPCRs sont décrites dans le tableau 1 en annexe. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois réplicas biologiques. Chaque réplica biologique contient un ensemble de cinq plantes. Les ensembles de données marqués d'un astérisque

sont significativement différents des plantes infiltrées avec les bactéries sauvages comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec * $P < 0,05$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (b) Des graines Col-0 ont été cultivées dans un milieu ½ MS et 9 jours plus tard, le milieu a été changé. 24 heures plus tard, on a traité les plantules avec 1 μM de COR. Des échantillons ont été prélevés à 0 et 15 minutes après le traitement pour l'extraction de l'ARN comme décrit dans Matériel et Méthodes. Des analyses qPCRs ont été menées pour quantifier le niveau d'expression du *RDSI*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de dix plantules. Les ensembles de données marqués d'un astérisque sont significativement différents des plantes contrôles au même point dans le temps comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec * $P < 0,05$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires. (c) Des plantes Col-0 et *coi1-30* ont été infiltrées avec 10 μM de COR. Des échantillons ont été prélevés à 0 et 15 minutes après infiltration pour l'analyse par RT-qPCR de l'accumulation de *RDSI*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de cinq plantes. Les ensembles de données marqués d'un astérisque sont significativement différents des plantes sauvages comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec ** $P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

3.2.6. Le miR472 contribue à la susceptibilité médiée par la coronatine

Les résultats ci-dessus montrent que le miR472 contribue à la suppression de l'immunité médiée par la COR. Ainsi, nous pensons que ceci aurait pour conséquence un effet sur la résistance. Alors, nous avons testé si le miR472 contribuait à l'induction de la susceptibilité médiée par la COR. Des plantes *A. thaliana* Col-0 et des mutants *mir472* ont été infiltrés sous vide avec *Pst* DC3000 ou *Pst* DC3118 à 10^5 cfu/mL, et la croissance bactérienne a été observée à 0 et 3 jours après inoculation (Figure 40). En comparant la croissance bactérienne chez les plantes sauvages Col-0 infectées avec *Pst* DC3000 versus *Pst* DC3118, on s'aperçoit que les plantes d'*A. thaliana* sauvages sont significativement moins susceptibles à *Pst* DC3118 qu'à *Pst* DC3000. Les bactéries incapables d'accumuler la COR sont moins virulentes que les bactéries sauvages. Ceci confirme que la COR est un facteur de virulence comme décrit auparavant (Mitchell, 1982).

Ensuite, en examinant la croissance bactérienne chez les plantes sauvages Col-0 *versus* *mir472* infectées avec *Pst* DC3000, on remarque que les mutants *mir472* sont moins susceptibles vis-à-vis de *Pst* DC3000 que les Col-0. Ce qui confirme ce que j'ai décrit auparavant, à savoir, que le miR472 favorise l'infection en compromettant l'immunité basale (Figure 36 a et b). En examinant les différences de croissance des deux bactéries *Pst* DC3000 et *Pst* DC3118 chez les Col-0 *versus* les *mir472*, on remarque que la différence de croissance bactérienne chez les Col-0 est plus importante comparativement à celle chez les *mir472*. Ce qui implique qu'une partie de la virulence de la COR passe par le miR472 et qu'il y a une partie indépendante de ce microARN.

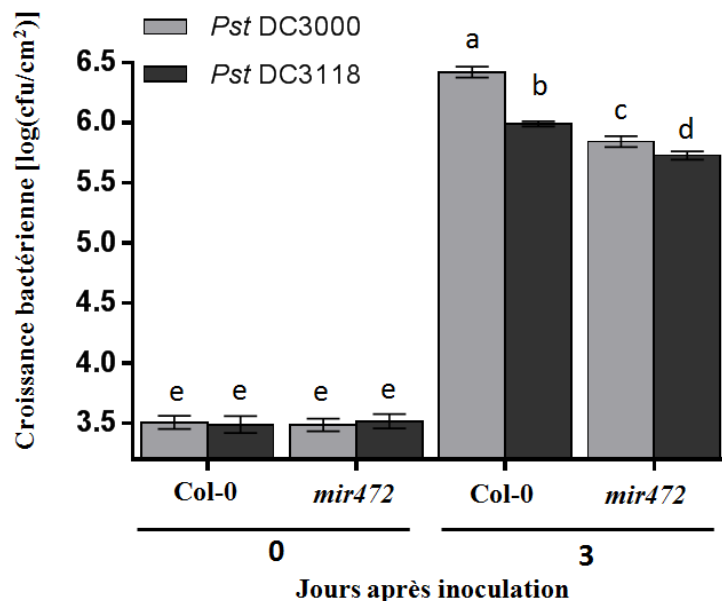


Figure 40. Croissance de *Pst* DC3000 et de *Pst* DC3118 infectant des plantes Col-0 et *mir472*.

Des plantes âgées de cinq semaines ont été infiltrées sous vide avec une solution à 10 mM de $MgCl_2$ contenant 10^5 cfu/mL de *Pst* DC3000 ou de *Pst* DC3118. Des disques foliaires ont été récoltés pour la quantification des bactéries à 0 et 3 jours après infiltration sous vide, comme décrit dans Matériel et Méthodes. Les bactéries ont été récupérées à partir des disques de feuilles et la croissance est déterminée en cfu/cm² de tissu foliaire. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=9). Les lettres au-dessus des barres indiquent la signification statistique. Les barres qui ne partagent pas les mêmes lettres présentent des différences de moyennes significatives tel que prévu par analyse de la

variance suivie d'un test de la différence la moins significative (LSD) avec ** $P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

3.2.7. L'inhibition de l'immunité basale par la COR nécessite en partie le miR472

La COR est un facteur de virulence qui agit sur différentes cibles (Geng *et al.*, 2012). Il a aussi été montré que la COR compromet le PTI induit par des PAMPs comme la Flg22 (Geng *et al.*, 2012). Comme le miR472 contribue à la susceptibilité induite par la COR et qu'il cible RDS1 pour inhiber le PTI induit par la Flg22, nous avons voulu déterminer si la COR compromet le PTI *via* le miR472. Nous avons analysé l'expression des gènes marqueurs du PTI induit par la Flg22. Pour ce faire, des plantules Col-0 et *mir472* ont été traitées avec 1 μ M de Flg22 ou avec 1 μ M de Flg22 et 1 μ M de COR. Ensuite, des échantillons ont été récoltés à 0 et 30 minutes après traitement pour l'extraction de l'ARN. Les analyses par qPCR ont été effectuées pour voir les niveaux relatifs d'expression des gènes induits par la Flg22. Les analyses par RTqPCR montrent que les niveaux des transcrits des marqueurs induits par la Flg22, à savoir, *FRK1* et *WRKY29* sont significativement augmentés chez les plantules *mir472* traitées à la Flg22 comparativement à celles sauvages ayant subies le même traitement (Figure 41 a et b). On confirme ainsi que le miR472 est un régulateur négatif du PTI puisque les mutants déficients de ce microARN accumule significativement plus les transcrits des gènes *FRK1* et *WRKY29*. En comparant l'expression de *FRK1* et de *WRKY29* chez les plantules sauvages Col-0 traitées uniquement avec la Flg22 *versus* les Col-0 traités à la Flg22 et à la COR, on met en évidence l'effet inhibiteur de la COR sur le PTI, comme décrit auparavant (Underwood, *et al.*, 2007). En comparant l'expression de *FRK1* et de *WRKY29* chez les plantules sauvages Col-0 *versus* les *mir472* ayant subi le même traitement (Figure 41 a et b), on confirme que l'inhibition de ces marqueurs du PTI requiert le miR472. Ce qui confirme ce que j'ai décrit auparavant, à savoir, que le miR472 favorise l'infection en compromettant l'immunité basale (Figure 36 a et b; figure 40). D'autant plus, en comparant le niveau d'accumulation de *FRK1* chez les plantules *mir472* traitées à la Flg22 *versus* celles traitées à la Flg22 et à la COR

(Figure 41 a), on démontre que cette inhibition de l'expression de *FRK1* médiée par la COR passe par le miR472 et qu'il y a une partie indépendante de ce microARN, d'où la corrélation avec ce qu'on observe dans la figure 40.

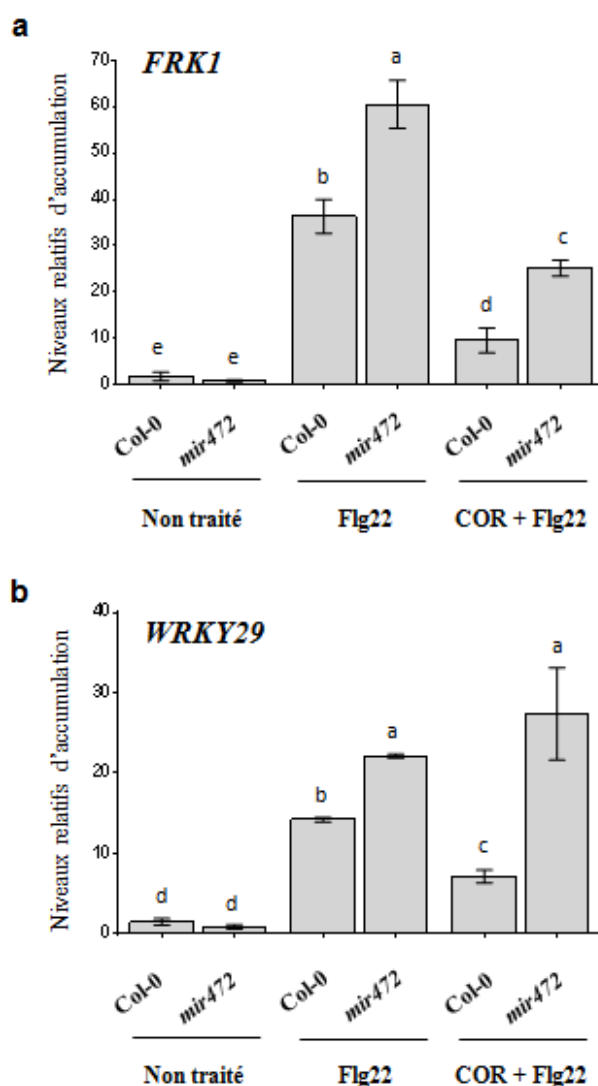


Figure 41. Le miR472 contribue à la suppression du PTI médiée par la COR.

La coronatine régule négativement l'expression de *FRK1* et *WRKY29*, deux gènes marqueurs induits par la Flg22 via le *miR472*. (a et b) Des graines Col-0 et *mir472* ont été cultivées dans un milieu ½ MS et 9 jours plus tard, le milieu a été changé. 24 heures plus tard, on a traité les plantules avec 1 μ M de Flg22 ou avec 1 μ M de Flg22 + 1 μ M de COR. Des échantillons ont été prélevés à 0 (non traité) et 30 minutes après traitement (avec Flg22 ou avec Flg22 + COR) pour l'extraction d'ARN comme décrit

dans Matériel et Méthodes. Des analyses qPCRs ont été menées pour voir le niveau d'expression des marqueurs induits par la Flg22, *FRK1* (a) et *WRKY29* (b). Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de dix plantules. Les lettres au-dessus des barres indiquent la signification statistique. Les barres qui ne partagent pas les mêmes lettres présentent des différences de moyennes significatives tel que prévu par analyse de la variance suivie d'un test de la différence la moins significative (LSD) avec $P < 0,01$ dans le cas de *FRK1* et avec $P < 0,05$ dans le cas de *WRKY29*. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

3.2.8. Étude du promoteur du miR472

Pour étayer le mécanisme d'activation du miR472 par la COR, nous avons étudié la séquence du promoteur du locus AT1G12294 du miR472. Douze sites correspondant à la séquence consensus (CANNTG) permettant la liaison au facteur de transcription de type MYC ont été retrouvés dans cette région (Zhenhai *et al.*, 2010) (Figure 42).

GCTCGATGCAGTCAAATACAGTATCATCATTGATGGTCTTTGCAAACACGGGAGCCTCGACAATGCATTCAACCT
 TTTCAATGAAATGGAATGAAAGGGATCACAACAAATATTATTACCTACAACATTCTCATTGGCGGCTTTTGTA
 TGCTGGTAGATGGGATGATGGTGCCAAGTTATTGAGGGATATGATCAAGAGGAAAATCAACCCCAACGTTGT
 CATTAGTGTGTTGATTGATAGTTTGTGAAAGAGGGAAAGCTTCGAGAGGCCGAAGAAGTGCACAAGGAGATGAT
 ACATCGAGGCATAGCTCCTGATACTATCACATACACTTCTTTGATAGATGGGTTTTGCAAGGAGAACCACCTAGA
 TAAGGCCAAC**CAGATG**GTGGATCTGATGGTTAGCAAAGGATGCGATCCTAATATCAGGACGTTTAATATCCTCAT
 AAATGGATATTGTAAGGCTAATCGAATTGACGATGGTTTGGAACTCTTCCGCAAAATGTCTTTGAGAGGAGTGGT
 TGCAGATACAGTTACTTATAACACTCTTATCCAAGGATTTTGTGAATTGGGAAAACCTTAATGTTGCCAAAGAACT
 CTTCCAAGAGATGGTTTCTCGTAAAGTTCTCCTAATATTGTGACCTACAAAATTTTGCTGGATGGGTTGTGTGA
 CAATGGGGAATCAGAAAAAGCGTTGGAAATATTTGAAAAAATAGAGAAGAGTAAGATGGAGCTTGATATTGGTAT
 CTATAACATCATCATTACGGGATGTGCAATGCTAGTAAGGTGGATGATGCTTGGGATTTATTCTGTAGCCTCCC
 CCTCAAAGGAGTGAAGCCCGGTGTCAAACATACAAATATAATGATTGGGGGACTGTGTAAGAAAGGCCCATTTGTC
 TGAAGCGGAAGTGTGTTTAGAAAAATGGAAGAGGATGGGCATGCGC**CAGATG**GTTGGACATACAACATACTCAT
 CAGGGCACATCTTGAGATGGTGTGCAACCAATCAGTTAAACTTATTGAAGAACTGAAGAGGTGCGGGTTCT**C**
AGTTGATGCTTCCACTATAAAGATGGTTATCGATATGTTATCGGATGGTAGATTGAAGAAAAGCTTTTTGGATAT
 GCTTTCTTAGAATGTTTGATCTTAATCAACCAGAGATAAAGCTAACTATTTCTCTAAGTATCA**CAACTG**TAGCAA
 ATCTACTAGCTTTTGAACCAACCTGAAAAACCTTCAGACTCTTGGAACTGGAAGTGTCTCTTAAGGTTGCGTTG
 TTTAGCAGAAAACCTTTGT**CAGGTG**TAAGATTGGAGATGGAAAGACTGCTAGTTTCTGGTTTGATAACTGGACTCC
 TTTTGGTCCCCTAATCAAGTTTCATTGGAA**CAGATG**GCCCTGTAGTTGAGAGCCCTTTGAATGCTAAGGTAGCT
 GATTTATATACT**CAGTTG**GTTGGACTCTAGCGGCTCCTAGAAGTGGTTTGGCGTGTGACCTTCTTATCTACCTC
 TCTACTATAGCGTTGCCTACTGACTCTGACGAGTTGGATCGGTGATGATTGGGTGGTGGAGACAAGTTATGCAAT
 GGGTTCTCCTCAGCTAAGACGTGGGAATTCTCAGACCAAGGTCGGATGTGGTTAGCTGGGCAAGCACAGTGTGGT
 TTAAAGGTGCAATTCCCAACATGTGCTT**CATATG**TGGGCAACAAATCTTGATCGCCTTCCCACTAAAGCTAGG

CTTGCTTCTTGGACATTGAGGACAGAGAC **CACCTTG**TTTTTGACTTGCGAATATGCGTGTTATATCTGGTATACTG
T TAGTGTGAGATTGGAGCTCCCTCCCATCAACTTTGTTGTGTGGAACGACCTCATGGCATGGACTCTTCAAAAGA
ACAAGCGTTACACGCCAACCAACTCTACGTAAGCTCATTGCTCAATCTGTTATCTATGC **CATTTG**GAAACAGAGAA
ATAATTTGCATCACAATCATGAGTATATTCTTCCATCGGTGATATTCAAGACCATTGACAGAGAGATTAAAAATT
CCATTACTGCAAGAAGACTGAAGAAGCGTTTCAGGCGGCTTATGACTCTTTGGTTGCACTAAAATGGGCTCAACC
CAGACTGATCTATATTGCTTGCTTGTTTTAACTTTTTGCCAAATCAATTTTCAAGGTTCAAACCCATGTAAAT
CTATCTTTTCATTTATATGATATTTGCAGTTTAGCAAAAAAACTATTTCTCGACTAGTGTATGATGTATTTGG
TCCTATTATTTCGAATCTTTGTTTCGCATCTAACCTGTTGACGTAGTCTGTGTTGAGGAGCCCCCATGAACCCAATA
TACATATTGTTCTGTTTTTCTATCTCTTAGTAGTTTTCTTAAATGCCTGAATATTTGTTGTTATTGCTAGACC
GCAAACGCAAAGTGCAATTTTATTTGGAGTGAGAGAATATGCCAAAATGTGCTATATGGGCTATATTTCTTTGTG
AAGAAGAAATGGGCTATCTGTTGAAATGGGTTCTCTGACAGGCCCTTTTCTTTATGGGCCCAAAGAGATGGCGG
CACCGCGTGGAAGATCATGTCTGAGCTGAGCTCGACAAACGGACAACGGACCATTACATAGATTCTTCTCGCAGA
GGTTCTTCCGTTTTTTTTTTTTTTCT **CATTTG**GCTATTCAATAGCTTAATTTTTTGATTAAAGTTAACCTTCTTTT
GGATCGATTGTGTGTGTTGTGCGAACTTGATAGGGTTTAGTGAAAGAAAGACTGAACTTTAATCAAATTTGTTA
TTTTTTGTTCTAATGATTCAAGATCTGGTTCTCTATTCTAATGATTTACTTAACTCAAATTAGCTTATGCTGTGT
TGTTAGTCTGTGAATCTCTTTATCTCTATTAGTGCAGTGATGCGTGTGTTTCTCTGTCTCAGTAT **CATTTG**AG
CATCAAGTTTTGTCAATGATTATGCGCCAAAGGGGAGTCATATTCTCATCAAAGATGGATTTCGGGATTACGCCTC

Figure 42. Séquence du promoteur d'ath-MIR472 (3kb).

Les douze sites de liaison du facteur de transcription MYC sont marqués en bleu.

Il a été montré que le facteur de transcription MYC2 (initialement appelé JIN1, pour JASMONATE INSENSITIVE1) est impliqué dans la régulation des gènes dépendants de la voie de l'AJ (Lorenzo et Solano, 2005). Bien que les mutants de cette voie de signalisation soient généralement plus susceptibles aux agents pathogènes nécrotrophes tels que *B. cinerea* (Glazebrook, 2005; Thomma *et al.*, 2001), le mutant d'*Arabidopsis* *jin1/myc2* est, toutefois, résistant envers *B. cinerea* (Nickstadt *et al.*, 2004). Fait intéressant, MYC2 participe à la régulation négative des défenses dépendantes de l'AS exercée par la coronatine (Nickstadt *et al.*, 2004; Laurie-Berry *et al.*, 2006). Le mutant *myc2* est aussi résistant à la bactérie hémibiotrophe *P. syringae*. Dans les expériences précédentes, j'ai montré que le mutant *mir472* présente un phénotype résistant envers *B. cinerea* (Figure 31) et envers *Pst* DC3000 (Figure 36). Tous ces arguments nous ont poussés à suggérer MYC2 comme le candidat idéal qui pourrait être impliqué dans la susceptibilité induite par la COR *via* le miR472.

3.2.9. La coronatine induit l'accumulation du MYC2

Pour étudier l'implication du MYC2 dans l'activation du miR472, il est important, en un premier temps, de valider dans notre système que la coronatine induit l'accumulation du MYC2 et compromet ainsi l'immunité basale, comme déjà décrit dans la littérature (Nickstadt *et al.*, 2004; Laurie-Berry *et al.*, 2006). Pour étudier l'accumulation du MYC2 médiée par la COR, nous avons réalisé une cinétique de l'accumulation du transcrit du *MYC2* par qPCR chez des plantules Col-0 suite à un traitement avec 1 μ M de COR comme montré à la figure 43. Des plantes témoins ont été incluses dans l'expérience. Les analyses par RTqPCR montrent que le niveau du transcrit du *MYC2* est significativement plus important chez les plantules Col-0 traitées à la COR comparativement aux plantes témoins, et ce à tous les temps testés. Ces résultats confirment que la COR régule positivement l'expression du *MYC2*.

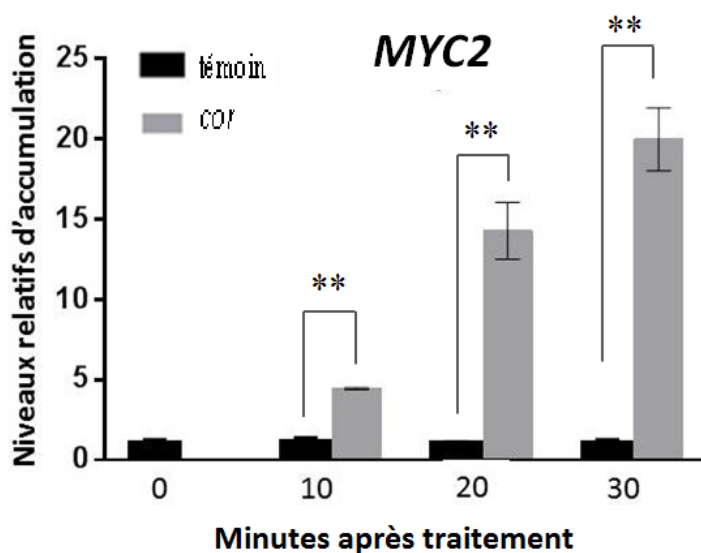


Figure 43. La coronatine induit l'accumulation du MYC2.

La coronatine régule positivement l'expression du *MYC2*. Des graines Col-0 ont été cultivées dans un milieu ½ MS et 9 jours plus tard, le milieu a été changé. 24 heures plus tard, on a traité les plantules avec 1 μ M de COR. Des échantillons ont été prélevés à 0, 10, 20 et 30 minutes après le traitement pour l'extraction d'ARN comme décrit dans Matériel et Méthodes. Des analyses qPCRs ont été menées pour

voir le niveau d'expression de *MYC2*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de dix plantules. Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des plantes contrôles au même point dans le temps comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec ** $P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

3.2.10. *MYC2* contribue à l'inhibition de l'immunité basale médiée par la COR

Après avoir prouvé l'activation de l'accumulation du *MYC2* par la COR dans notre système, il est important de tester si *MYC2* contribue à la suppression de l'immunité médiée par la COR. Ainsi, nous avons analysé l'expression du gène *WRKY29*, un marqueur du PTI, en réponse aux traitements par la Flg22 et/ou la COR. Pour ce faire, des plantules Col-0 et *myc2-2* ont été traitées avec 1 μ M de Flg22 ou avec 1 μ M de Flg22 et 1 μ M de COR. Ensuite des échantillons ont été récoltés à 0 et 30 minutes après traitement pour l'extraction de l'ARN. Les analyses par RTqPCR montrent que le niveau du transcrit de *WRKY29* a significativement diminué chez les plantules Col-0 traitées à la Flg22 et à la COR comparativement à celles Col-0 traitées seulement à la Flg22 (Figure 44). D'où, la confirmation que la COR régule négativement *WRKY29*. Ensuite, en comparant les plantules Col-0 et celles *myc2-2* traitées toutes à la Flg22 et à la COR, on voit qu'il y a une augmentation significative du niveau de l'accumulation du transcrit *WRKY29* chez les *myc2-2* ce qui implique que la régulation négative exercée par la COR sur le *WRKY29* requiert le *MYC2*. En outre, on a déjà mis en évidence que la COR induit l'accumulation du miR472 (Figure 38 c) et qu'elle compromet ainsi le PTI (Figure 41). Il est donc légitime de supposer que la COR régule le miR472 *via* l'activation du *MYC2*.

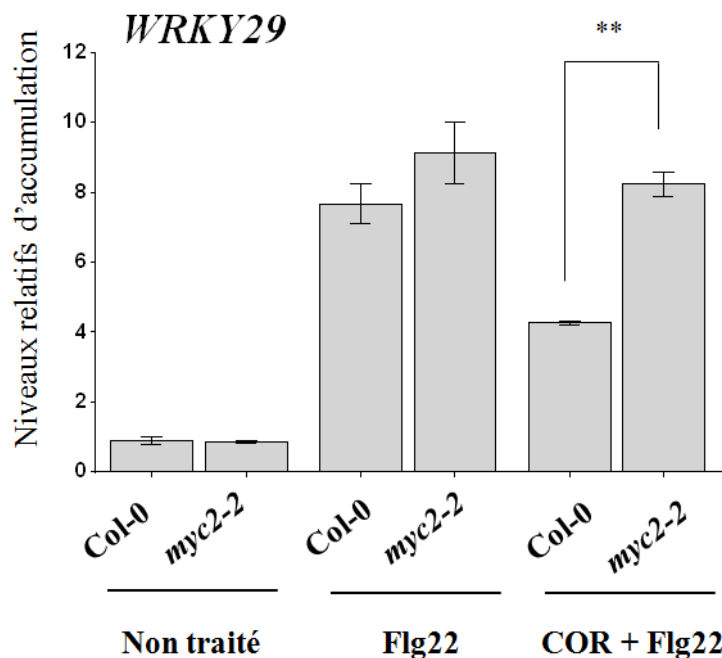


Figure 44. La coronatine affecte le PTI induit par la Flg22 via le MYC2.

La coronatine régule négativement l'expression de *WRKY29*, un gène marqueur induit par la Flg22 via le *MYC2*. Des graines Col-0 et *myc2-2* ont été cultivées dans un milieu ½ MS et 9 jours plus tard, le milieu a été changé. 24 heures plus tard, on a traité les plantules avec 1 µM de Flg22 ou avec 1 µM de Flg22 + 1 µM de COR. Des échantillons ont été prélevés à 0 (non traité) et 30 minutes après traitement (avec Flg22 ou avec Flg22 + COR) pour l'extraction d'ARN comme décrit dans Matériel et Méthodes. Des analyses qPCRs ont été menées pour voir le niveau d'expression du marqueur induit par la Flg22, *WRKY29*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de dix plantules. Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des plantes sauvages au même point dans le temps comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec ** $P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

3.2.11. *MYC2* régule positivement l'accumulation du miR472

Tous les travaux effectués avec le système d'interaction *Arabidopsis-Pseudomonas* préparent un terrain favorable et présentent le *MYC2* comme un excellent candidat pour l'activation du

miR472. Pour pouvoir valider cette hypothèse, on a quantifié le niveau d'expression du miR472 chez des plantes Col-0 et *myc2-2* (Figure 45 a). Les analyses par RTqPCR montrent que le niveau d'expression du miR472 est significativement moins important chez les mutants *myc2-2* comparativement aux sauvages et ce d'une manière constitutive. Par la suite, on a quantifié l'expression de la cible du miR472 *RDS1* (Figure 45 b). Cette cible est significativement plus accumulée chez les mutants *myc2-2* comparativement aux sauvages et ce d'une manière constitutive. D'où, la confirmation que le *MYC2* régule positivement le miR472 et permet ainsi l'inhibition de sa cible *RDS1*.

Pour tester si le *MYC2* compromet la voie de l'AS en induisant le miR472, nous avons regardé l'expression du marqueur de cette voie *PR5* chez les plantes Col-0 ainsi que les mutants *myc2-2*. Des échantillons ont été récoltés pour l'extraction d'ARN. Les analyses RTqPCR montrent que les niveaux d'expression de ce gène ont significativement augmenté chez les mutants *myc2-2* comparativement aux plantes sauvages (Figure 45 c). Ces résultats montrent que le *MYC2* régule négativement la réponse immune médiée par l'AS. Ces données renforcent l'idée que le *MYC2* induit le miR472 qui inhibe *RDS1* et permet ainsi de compromettre la réponse de défense médiée par la voie de l'AS.

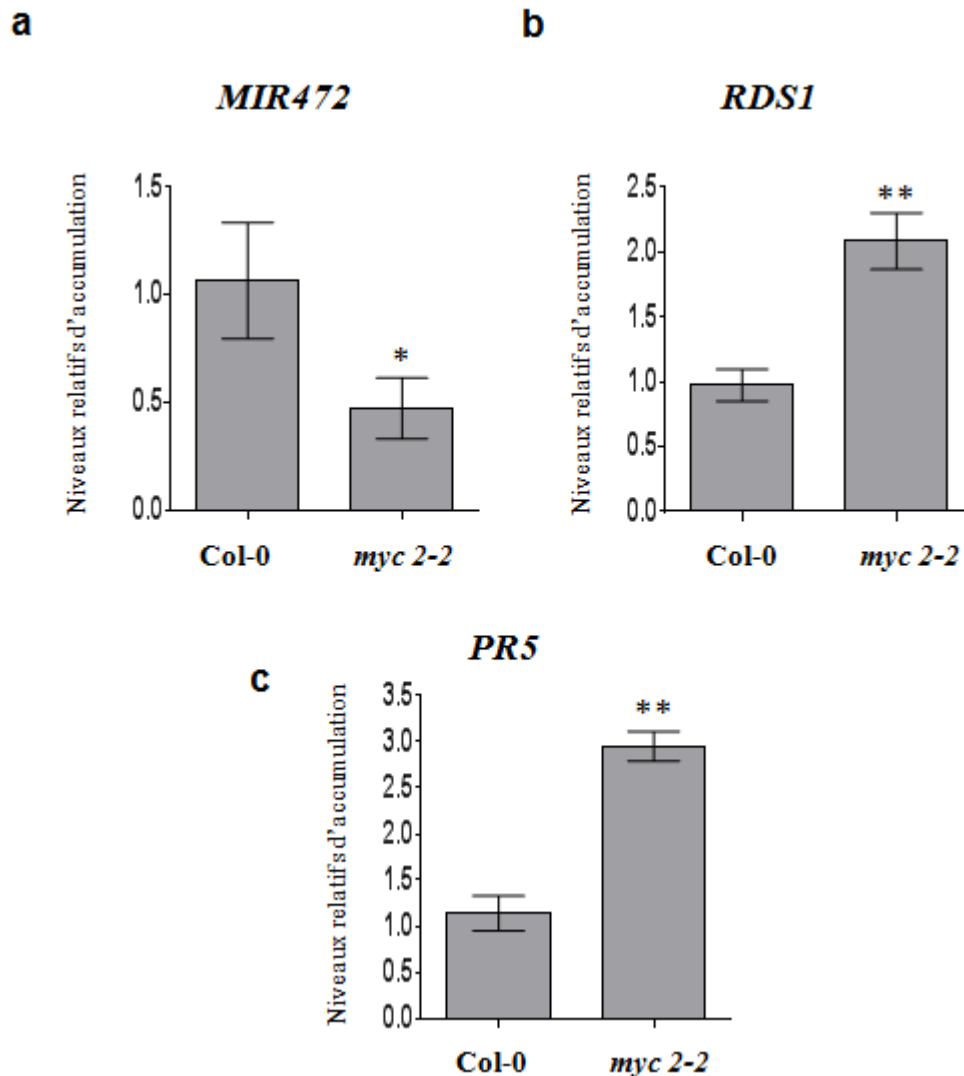


Figure 45. *MYC2* régule positivement l'accumulation du miR472 et permet l'inhibition de l'expression de *RDS1* ainsi que de *PR5*.

(a-c) Des graines Col-0 et *myc2-2* ont été cultivées dans un milieu ½ MS et 9 jours plus tard, le milieu a été changé. 24 heures plus tard, des échantillons ont été prélevés pour l'extraction d'ARN comme décrit dans Matériel et Méthodes. Des analyses qPCRs ont été menées pour voir le niveau d'expression du *MIR472* (a), de sa cible *RDS1* (b) ainsi que *PR5*, marqueur de la voie de l'AS (c). Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois répliques biologiques. Chaque réplique biologique contient un ensemble de dix plantules. Les ensembles de données marqués d'astérisques sont significativement différents des plantes sauvages comme prévu par le test de Tukey à intervalle de Student (HSD) avec * $P < 0,05$ ou avec ** $P < 0,01$. Les expériences ont été répétées au moins trois fois avec des résultats similaires.

3.3. Discussion

Le modèle *P. syringae* pv tomato DC3000-*Arabidopsis*, nous a permis de disséquer plus en profondeur comment la bactérie manipule la machinerie de la plante pour activer la voie des microARNs menant à l'accumulation du miR472 responsable de la suppression de la résistance basale. En effet, nos résultats montrent l'accumulation du miR472 suite à l'infection par *P. syringae*, ainsi que son implication dans la maladie causée par cet agent pathogène chez *A. thaliana*. Ensuite, nous avons démontré que le miR472 affecte les réponses de défense médiées par la voie de l'AS en quantifiant des marqueurs de cette voie à savoir PR1 et PR5. Ces résultats sont en accord avec les résultats publiés par Boccara *et al.*, 2014. Ensuite, nous avons montré que *RDS1* contribue à la résistance basale requise pour lutter contre *Pst* DC3000. En effet, la suppression du PTI par le miR472 passe par l'inhibition de sa cible, la protéine NB-LRR; *RDS1* (AT5G05400), un nouveau régulateur impliqué dans l'immunité innée. Le fait que *RDS1* est régulé 15 minutes après le traitement suggère qu'il pourrait avoir un rôle à jouer dans les réponses précoces liées à l'immunité innée. En plus, le PTI induit par la Flg22 n'est pas complètement compromis chez les plantes mutantes *rds1*. Tous ces arguments, suggèrent que *RDS1* pourrait agir en aval de la reconnaissance FLS2-Flg22. Il est à noter que FLS2 forme un complexe avec les protéines R CC-NB-LRR; RPM1, RPS2 et RPS5 (Qi *et al.*, 2011). Ainsi, on ne peut pas exclure que *RDS1* pourrait faire partie du complexe FLS2 requis pour la reconnaissance de la Flg22. Il est à noter également que *RDS1*, ainsi que toutes les cibles prédites du miR472, s'inscrivent dans le même clade phylogénétique que *RPS2* et *RPS5* ce qui peut suggérer une fonction conservée (Meyers, *et al.*, 2003). Les autres cibles prédites du miR472 pourraient aussi avoir des fonctions redondantes. Un défi pour l'avenir serait de déterminer comment la protéine CC-NB-LRR *RDS1* contribue au PTI. Comme les protéines NB-LRR sont normalement associées à l'ETI contre les agents pathogènes, il sera intéressant de vérifier si *RDS1* a également un rôle dans l'ETI ou si elle représente une nouvelle classe de protéines de signalisation.

Mes résultats montrent aussi que l'activation du miR472 par *Pst* DC3000 dépend de la coronatine. Cette toxine d'origine bactérienne est connue comme responsable de multiples effets menant à la mise en place de la maladie (Brooks *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2005; Melotto *et al.*, 2006; Mittal et Davis, 1995). Mes travaux de recherche ajoutent une nouvelle fonction de la COR qui consiste en une activation du miR472 menant à une suppression de la résistance basale et la mise en place de la maladie.

L'étude de la séquence du promoteur du locus AT1G12294 du miR472 a permis de mettre en évidence douze sites de liaison du facteur de transcription MYC. Il est démontré que le facteur de transcription MYC2 (ou JIN1, pour JASMONATE INSENSITIVE1) joue un rôle important dans la régulation des gènes dépendants de la voie de l'AJ. (Lorenzo et Solano, 2005). Bien que les mutants de cette voie de signalisation soient généralement plus susceptibles aux agents pathogènes nécrotrophes comme *B. cinerea* (Glazebrook, 2005; Thomma *et al.*, 2001), le mutant *jin1/myc2* a cependant, montré une résistance contre cet agent pathogène (Nickstadt *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que MYC2 est aussi impliqué dans la suppression des défenses médiées par l'AS exercée par la coronatine (Nickstadt *et al.*, 2004; Laurie-Berry *et al.*, 2006), d'où, le mutant de *MYC2* est aussi résistant à *P. syringae*. L'étude de ce facteur a montré qu'il régule positivement le miR472 et permet ainsi l'inhibition de sa cible *RDSI*. Nous avons aussi produit des résultats qui montrent que le *MYC2* régule négativement l'expression de *PR5*, un marqueur de la voie de l'AS. Tous ces résultats renforcent l'idée que le *MYC2* induit le miR472, qui *via* l'inhibition de sa cible *RDSI*, compromet la résistance basale. Malgré ces données qui convergent vers une régulation transcriptionnelle du *MIR472* par le facteur de transcription MYC2, l'interaction directe entre le MYC2 et son site de liaison au niveau du promoteur du *MIR472* n'a pas encore été mise en évidence. À la lumière de toutes ces données, on pourrait se demander pourquoi la plante possède-t-elle le miR472 qui semble ne pas fonctionner à son avantage. Toutefois, on pourrait imaginer des rôles avantageux de ce microARN pour la plante.

Premièrement, il pourrait être impliqué dans la régulation de l'antagonisme AS-AJ. En effet, cet antagonisme est bien documenté. Des travaux effectués sur la tomate (*Solanum lycopersicum*) et sur *Arabidopsis* ont démontré que l'AS et son dérivé acétylé l'aspirine sont des antagonistes forts de la voie de signalisation médiée par l'AJ (Doherty, *et al.*, 1988), et que l'AJ et l'Et peuvent agir en synergie (Penninckx, *et al.*, 1998). L'ère génomique a fourni une multitude de nouvelles avancées qui permettent d'enquêter sur la façon dont les voies de signalisation dépendantes de l'AS, l'AJ et l'Et sont interconnectées dans le réseau de signalisation des défenses induites (Katagiri, *et al.*, 2004). D'ailleurs, l'étude des profils d'expression de l'ensemble du génome d'un grand nombre de mutants d'*Arabidopsis* affectés au niveau de leur voie de signalisation dépendantes de l'AS, l'AJ et l'Et en réponse à l'infection par l'agent pathogène bactérien hémibiotrophe *P. syringae* (Glazebrook *et al.*, 2003), a confirmé qu'il existe un dialogue entre ces différentes voies et ouvre la voie à la modélisation d'un réseau de réponses immunitaires (Katagiri, *et al.*, 2004). Un des exemples les mieux étudiés du dialogue de signaux liés à la défense est l'interaction antagoniste entre les voies médiées par l'AS et celles médiées par l'AJ. De nombreux cas d'antagonisme entre la résistance dépendante de l'AS requise pour contrer les agents pathogènes biotrophes et la défense dépendante de l'AJ déployée contre les agents pathogènes nécrotrophes ainsi que les insectes herbivores ont été documentés (Stout, *et al.*, 2006; Bostock, *et al.*, 2005). Par exemple, l'induction de la voie de l'AS chez *Arabidopsis* par l'agent pathogène biotrophe oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis* réprime fortement les défenses médiées par l'AJ activées par les lésions apportées par le mode d'alimentation des chenilles de *Pieris rapae* (small cabbage white) (Koornneef, *et al.*, 2008). L'activation de la voie de l'AS par *P. syringae* supprime aussi la signalisation à l'AJ et rend les feuilles infectées au champignon nécrotrophe *A. brassicicola* plus susceptibles (Spoel, *et al.*, 2007). En effet il est connu que le MYC2 joue un rôle pivot dans cet antagonisme. Il a été montré que le mutant d'*Arabidopsis jin1/myc2* présente une résistance accrue envers *B. cinerea* (Nickstadt, *et al.*, 2004). Fait intéressant, le MYC2 est également impliqué dans l'immunité systémique SAR induite par les bactéries (Truman, *et al.*, 2007). En outre, MYC2 est impliqué dans la médiation de la suppression de défenses dépendantes de l'AS par la coronatine, qui mime l'action des jasmonates (Nickstadt, *et al.*, 2004; Laurie-Berry, *et al.*, 2006), ce qui rend ce facteur de

transcription un nœud important dans le réseau de signalisation AS-AJ/Et. MYC2 est impliqué dans l'antagonisme qui existe entre l'AS et l'AJ. Il est possible que le miR472 ait un rôle dans ce dialogue entre l'AS et l'AJ. Cependant, son rôle serait mineur car miR472 régule négativement les deux voies AS et AJ.

Deuxièmement, il est possible qu'il soit impliqué dans la balance de l'immunité *versus* du développement. D'ailleurs, il est admis que lorsque la plante se développe, l'immunité est compromise et quand elle s'immunise, le développement est compromis. Pour permettre cette régulation la plante utilise les hormones végétales comme molécules de signalisation qui régulent la croissance des plantes, le développement et les réponses aux stimuli biotiques. Par exemple, la phytohormone AJ est un composé dérivé lipidique qui joue un rôle important dans la régulation de la croissance des plantes et dans la défense contre divers agents pathogènes (Browse, 2005; Wasternack, 2007; Pieterse *et al.*, 2012). L'AJ régule divers aspects de la croissance des plantes et du développement tels que la germination des graines, la croissance des racines, et le développement des fleurs (Wasternack, 2007). En outre, l'AJ remplit la fonction principale de régulateur dans l'induction de réponses de défense contre un large spectre d'insectes herbivores (Howe et Jander, 2008; Erb *et al.*, 2012), ainsi que les agents pathogènes nécrotrophes (Pieterse *et al.*, 2009). Chez *A. thaliana*, la voie de l'AJ comporte deux branches principales, la voie qui passe par le facteur de transcription MYC2 et celle qui passe par les facteurs de transcription du type ERF (Ethylen Responsive Factors). Chaque branche active différents ensembles de gènes en réponse à l'AJ (Lorenzo et Solano, 2005; Wasternack, 2007; Pieterse *et al.*, 2012; Kazan et Manners, 2013). La voie dépendante du MYC2 agit en synergie avec la signalisation par l'acide abscissique (ABA), tandis que la branche dépendante du ERF communique avec la voie de signalisation par l'Et (Abe, 2002; Lorenzo *et al.*, 2003). MYC2 sert à la fois comme activateur et répresseur transcriptionnel dans la régulation des différentes voies de la signalisation médiée par l'AJ. L'analyse par microarray a permis l'identification d'un grand nombre de gènes sensibles à l'AJ dont l'expression est significativement plus élevée ou plus faible chez le mutant *myc2* comparativement aux plantes du type sauvage (Dombrecht *et al.*, 2007). Fait important, les

gènes régulés négativement par MYC2 et qui sont dépendants de l'AJ comprennent des gènes impliqués dans la défense tels que *PDF1.2*, *CHIB* et *PR4* (Anderson *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2004). En plus de son rôle dans l'immunité, l'AJ joue aussi un rôle très important dans le développement (Wasternack, 2007). Il n'est ainsi pas impossible que l'AJ utilise la voie MYC2-miR472 pour répondre aux besoins de la plante au moment du développement et aussi en réponse à l'infection.

CONCLUSION

Les plantes, tout comme les animaux, sont en permanence exposées à l'agression des agents pathogènes. Comme tous les organismes multicellulaires, elles ont élaboré au cours de leur évolution des systèmes de défense efficaces, dont certains sont constitutifs et d'autres induits. Il est maintenant établi que l'acide jasmonique joue un rôle important dans la résistance des plantes contre les agents pathogènes nécrotrophes comme *B. cinerea* et *A. brassicicola* et que l'acide salicylique est requis pour faire face aux agents pathogènes biotrophes ou hemi-biotrophes comme *P. syringae* pv tomato DC3000. Pour que l'agent pathogène colonise efficacement l'organisme de l'hôte, il doit développer des mécanismes pour échapper à la détection et/ou trouver un moyen pour déjouer les réponses de défense.

Les interactions continues entre les plantes et les agents pathogènes ont mené à une coévolution (Modèle en zigzag) et une diversité des stratégies d'attaque et de défense. Actuellement, il y a un intérêt universel qui porte sur les mécanismes utilisés par les agents pathogènes pour supprimer l'induction des défenses chez l'hôte. Lors de mes travaux de recherche, je me suis intéressée à l'un de ces mécanismes en particulier au rôle de la voie des microARNs dans l'immunité des plantes. J'ai produit des résultats qui mettent en évidence l'implication de DCL1 et d'AGO1, deux protéines clés dans la voie des microARNs, dans la sensibilité d'*A. thaliana* à *B. cinerea* et *A. brassicicola*. Ces résultats nous ont menés à mon second objectif de thèse qui implique la caractérisation des miARNs régulés en réponse à l'infection. Pour réaliser cet objectif, nous avons utilisé la puce LC sciences qui comprend 1023 miARNs. L'analyse du microarray, m'a permis de dégager 19 microARNs induits et 9 réprimés. Parmi les microARNs induits, nous nous sommes intéressés à un microARN en particulier, le miR 472. Le logiciel de prédiction des cibles de miARNs nous a révélé que le miR472 ciblerait plusieurs gènes putatifs appartenant à une seule famille de gènes de

résistance de la classe CC-NB-LRR. Certains de ces gènes ont été déjà montrés, expérimentalement, être les cibles du miR472.

Par la suite, l'étude de l'importance du miR472 dans l'interaction d'*A. thaliana* avec les deux modèles nécrotrophes, à savoir, *B. cinerea* et *A. brassicicola* a permis de mettre en évidence que le miR472 favorise le développement des nécrotrophes en inhibant des réponses de défense dépendante de la voie de l'AJ. L'effet du miR472 nécessite RDR6, une protéine qui joue un rôle important entre autres dans l'action des miRNAs de 22 nts. Ainsi, j'ai montré que la voie de l'extinction à l'ARN qui passe par miR472-RDR6 chez *Arabidopsis*, compromet la voie de défense dépendante de l'AJ, favorisant ainsi les maladies causées par les agents pathogènes nécrotrophes.

Par la suite, j'ai montré que cette voie miR472-RDR6 cible RDS1, un gène du type CC-NB-LRR, pour réprimer les réponses de défense de la plante et ainsi favoriser l'infection. Mes travaux de recherche montrent pour la première fois qu'un gène présentant des similitudes avec des protéines de résistance permet la mise en place de la résistance basale médiée par l'AJ.

Enfin, je me suis focalisée sur la dissection du mécanisme moléculaire d'activation du miR472. Pour ce faire, j'ai utilisé le modèle *P. syringae* pv tomato DC3000-*Arabidopsis*, pour disséquer comment la bactérie manipule la machinerie de la plante pour activer la voie des microARNs menant à l'accumulation du miR472 responsable de la suppression de la résistance basale. En un premier temps, j'ai confirmé que *Pst* DC3000 induit bel et bien l'accumulation du miR472. Ensuite, j'ai vérifié que ce miR472 contribue à la maladie causée par *Pst* DC3000 chez *A. thaliana*, et ceci grâce aux tests d'infection en un premier temps, ainsi que la quantification des marqueurs de défense reliés à la voie de l'AS à savoir PR1 et PR5 en un second temps (ces résultats étaient inédits jusqu'à la récente publication de Boccara *et al.*,

2014). Ensuite, j'ai montré que *RDS1* réduit la susceptibilité d'*A. thaliana* à *Pst* DC3000, d'où son implication dans l'immunité basale. Le fait que RDS1 contribue au PTI induit par la Flg22 suggère que cette protéine pourrait faire partie du complexe FLS2 requis pour la reconnaissance de la Flg22 ou qu'elle fonctionne en aval de la voie de signalisation induite par la reconnaissance Flg22-FLS2. Ceci est révolutionnaire car les NB-LRRs sont connus à date comme étant, principalement, des récepteurs; cela suggère que RDS1 pourrait émerger comme un acteur en aval de capteurs microbiens et qu'il pourrait représenter une nouvelle classe de protéines de signalisation. D'où, il serait intéressant d'effectuer des travaux pour tester si la protéine RDS1 fait partie du complexe Flg22-FLS2 et ce par des expériences de co-immunoprécipitation (COIP). Pour tester si RDS1 fonctionne plutôt en aval de la voie de signalisation Flg22-FLS2, il serait pertinent d'analyser les premières réactions déclenchées par la perception de la Flg22, comme l'accumulation d'espèces actives d'oxygène (ROS).

Je me suis aussi intéressée au mécanisme d'induction de la maladie *via* le miR472, et mes résultats montrent que *Pst* DC3000 utilise son facteur de virulence la coronatine pour activer l'accumulation du miR472 et ainsi rendre *A. thaliana* susceptible à l'infection. Cette activation est COI1 dépendante. L'analyse du promoteur du miR472 nous a permis de trouver plusieurs sites de liaison des facteurs de transcription du type MYC. Nous avons privilégié MYC2 parce qu'il est activé par la COR, impliqué dans la voie COR-COI1 et qu'il favorise la maladie causée par *B. cinerea* et *Pst* DC3000. Effectivement, l'accumulation du miR472 est contrôlée par MYC2. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) sont nécessaires pour voir si MYC2 agit directement sur miR472. Par ailleurs, il est déjà établi que la COR induit une susceptibilité systémique chez *A. thaliana* lors d'infections secondaires par *P. syringae* (Cui *et al.*, 2005). Cependant la translocation de cette toxine des tissus infectés à ceux distants n'a pas été démontrée à jour. Par ailleurs, on sait que les petits ARNs se déplacent de cellule en cellule et parcourent de longues distances *via* le système vasculaire pour altérer l'expression de leur cible (Melnik *et al.*, 2011). D'où l'hypothèse, que le miR472, et/ou les petits ARNs qui en découlent, pourraient se déplacer vers les tissus distants et y induire la susceptibilité systémique induite par la COR. Des expériences préliminaires

réalisées par Khalfaoui (données non publiées) laissent penser que le miR472 constitue un potentiel acteur impliqué dans la susceptibilité systémique induite par la COR de *Pst* DC3000. Pour tester cette hypothèse, des expériences d'infiltration pourraient être envisagées où l'on infiltre des feuilles inférieures de plantes Col-0 (WT) et *mir472* soit avec *Pst* DC3000 ou avec *Pst* DC3118. Ensuite, l'échantillonnage comprendra les feuilles infectées ainsi que celles distantes et ce pour quantifier le miR472. Il serait également important de faire cette même expérience et d'effectuer une infection secondaire, quelques jours plus tard, sur les feuilles distantes pour tester la croissance bactérienne et quantifier les marqueurs de la voie de l'AS. Il serait aussi intéressant d'envisager des expériences de greffage en utilisant des plantes Col-0 (WT) comme porte-greffe et des plantes *mir472* comme greffon pour étudier la migration du miR472 et/ou les petits ARNs qui en découlent du porte-greffe vers le greffon. Ces expériences devraient amener à élucider le rôle du miR472 dans la susceptibilité systémique induite par la COR. La figure 46 récapitule les résultats ainsi que les perspectives qui en découlent.

Les résultats produits au cours de ma thèse s'inscrivent dans le cadre d'une meilleure compréhension de l'interaction plante-agent pathogène. Ces résultats permettent d'importants progrès dans la compréhension du système immunitaire des plantes et ceci va de pair avec les objectifs du laboratoire d'appliquer le savoir fondamental de l'immunité des plantes pour générer des cultures résistantes, soit transformées génétiquement ou traitées avec des composés stimulateurs de défenses naturelles. Le tout s'inscrit dans le cadre de la découverte de nouveaux moyens de lutte phytosanitaires plus respectueux pour l'Homme et l'environnement.

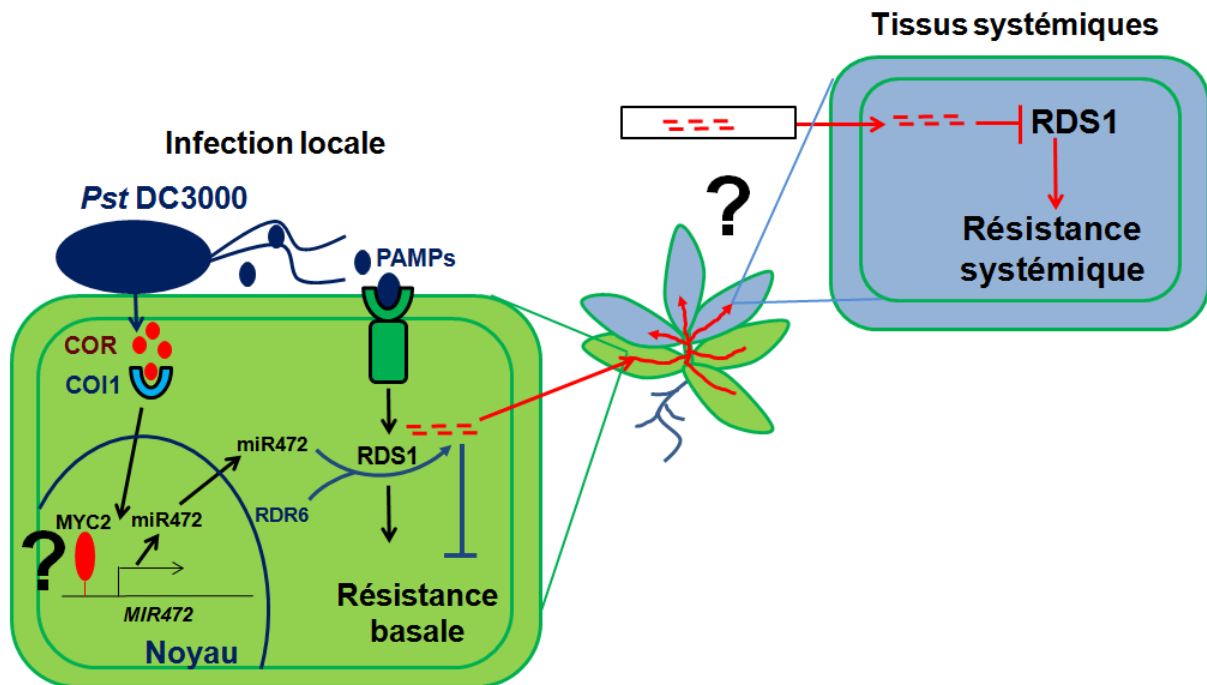


Figure 46. Modèle intégratif des résultats et des perspectives.

Nous avons montré que *Pst* DC3000 utilise son facteur de virulence COR pour activer la transcription du miR472 chez *Arabidopsis*. COR utilise le récepteur COI1 pour induire l'accumulation du miR472. Nous pensons que la COR régule positivement le miR472 via le facteur de transcription MYC2. Cependant, il reste à tester si MYC2 est recruté au niveau du promoteur du miR472. J'ai par la suite montré que la voie de l'extinction à l'ARN qui passe par miR472-RDR6 régule négativement le niveau de *RDS1*, une cible du miR472, menant à la suppression de la résistance basale. J'ai aussi montré que *RDS1* contribue au PTI induit par la Flg22. L'hypothèse que le miR472 constitue un potentiel acteur impliqué dans la susceptibilité systémique induite par la COR s'impose comme perspective.

ANNEXES

Tableau annexé 1. Amorces utilisées dans cette étude. F et R sont respectivement sens et antisens.

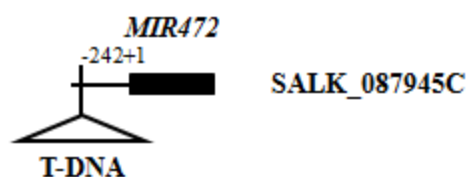
Gène	Locus	Amorces (5' - 3')	Expérience
<i>EF 1α</i>	AT5G60390	F: TCTCCGAGTACCCACCTTTG	qPCR
		R: TCCTTCTTGTCCACGCTCTT	
<i>PDF1.2</i>	AT5G44420	F: GCGAGAAGCCAAGTGG	qPCR
		R: GATCCATGTTTGGCTCCT	
<i>RDS1</i>	AT5G05400	F: TCATCGGCACTCTCACTC	qPCR
		R: CAGAGCCATTTTCGCG	
<i>ARNr 5S</i>	AT3G41979	F: ACGTCTGCCTGGGTGTCACAA	qPCR
<i>MIR472</i>	AT1G12294	F: TTCCTACTCCGCCATAC	qPCR
		R: GCGAGCACAGAATTAATACGACT	qPCR (Adaptateur)
MIR472	AT1G12294	F: TTGCACTAAAATGGGCTCAAC	Génotypage
		R: GTGTATGTATGGTATGGGCG	Génotypage/Sequénçage
CC-NB-LRR	AT1G61310	F:TCTTCAACATCTATGTTCAACAAAAG	Génotypage/ RT-PCR
		R: CCCTTACCCGTGCAAAC	Génotypage/Sequénçage/RT-PCR
CC-NB-LRR	AT4G27190	F: GTTAAAGCAGAGGGATCGTCC	Génotypage/ RT-PCR
		R: TACCCATTGGATTCTTGCAAG	Génotypage/Sequénçage/RT-PCR
CC-NB-LRR	AT1G12290	F: TCAGGTAAATCCCACAAGTGC	Génotypage/ RT-PCR
		R: CGGTACTCTTGTGTTGTGCCTC	Génotypage/Sequénçage/RT-PCR
CC-NB-LRR	AT5G47260	F: GAGTAGGCAAAACCACCTTC	Génotypage/ RT-PCR
		R: GTTGTAAGCTCGGAACACTGG	Génotypage/Sequénçage/RT-PCR
CC-NB-LRR	AT1G51480	F:GCCCTACCAATTTCATTATATTAACA	Génotypage/ RT-PCR
		R: GCCACAAGTTTCCAGGTATG	Génotypage/Sequénçage/RT-PCR
CC-NB-LRR	AT5G05400	F: GTAACGGTTTTGAGCACAATG	Génotypage
		R: ACTCAAAGTGCCACTTGCAAC	Génotypage/Sequénçage
CC-NB-LRR	AT5G05400	F: ACTCAAAGTGCCACTTGCAAC	RT-PCR
		R: TTAGCTTGGGAAAAAACGCTC	
CC-NB-LRR	AT5G43730	F: GTCGCTTAATCGTTTCGTCAG	Génotypage
		R: CATCCGTTGACTAGAGCAAGC	Génotypage/Sequénçage
CC-NB-LRR	AT5G43730	F: ATGGTGGACTGGCTTTCCTA	RT-PCR
		R: AGGCTTCCCATGCTATTCCA	
CC-NB-LRR	AT4G10780	F: AAAACAATAAGACGGCTGTGCG	Génotypage
		R: CATTGAACTTCCATTGGATCG	Génotypage/Sequénçage
CC-NB-LRR	AT4G10780	F: CCAAACTTGAGATGAGGCCTAT	RT-PCR
		R: CATTGAACTTCCATTGGATCGTG	

<i>Tubuline</i>	AT5G62700	F:GTCACTCATTGGGAGGAGGA	RT-PCR
		R: AGCGGTACTGCTGTGAACCT	
		F:TGGTTACGTAAGTGGGCCATCG	Génotypage/Sequénçage (Lba1)
Botrytis Actine	BC1G_08198	F:CCAATCAACCCAAAGTCCAA	qPCR
		R: AGGGAGAGGACGGCTTGAAT	
<i>PR1</i>	AT2G14610	F: TTACTGGCTATTCTCGATTTTAAATC	qPCR
		R: TATCTTGAGCTTTCGAGGGAA	
<i>PR5</i>	AT1G75040	F: TCGAGGATTTTCAAGAACGC	qPCR
		R: AAGCTTCGGTTTTTAAGGGC	
<i>FRK1</i>	AT2G19190	F: TCGTTTAAGCTTCGGTACTTG	qPCR
		R: CCAGGTGGTTGAAGAAGAGA	
<i>WRKY29</i>	AT4G23550	F: GCGTAAATACGGGCAGAAAC	qPCR
		R: GGTTTGGGTTGGGAAGTTTT	
<i>MYC2</i>	AT1G32640	F: CGCGAGTATGTCGGTGGTTA	qPCR
		R: TGCTCTGAGCTGTTCTTGCGTATA	
CC-NB-LRR	AT5G05400	GTGGCAATATCCTGTGACCAG	RACE
CC-NB-LRR	AT5G05400	CTTACAAGCTGCCTTAGCAGG	RACE nichée
OLIGO ARN	ANCRE	PO_GCACTTGACTAGGATCCACTGAAT TCTTTAGTGAGGGTTAATTGCC NH2	RACE
OLIGO ADN	ANCRE	GGCAATTAACCCTCACTAAAG	RACE
OLIGO ADN	ANCRE	AAAGAATTCAGTGGATCCTAG	RACE nichée

Tableau annexé 2. Liste des cibles prédites du miR472 utilisées dans cette étude.

Locus	Type de gne
AT5G47260	CC-NB-LRR
AT1G51480	CC-NB-LRR
AT1G12290	CC-NB-LRR
AT4G27190	CC-NB-LRR
AT1G61310	CC-NB-LRR
AT5G43730	CC-NB-LRR
AT4G10780	CC-NB-LRR
AT5G05400	CC-NB-LRR

a



b

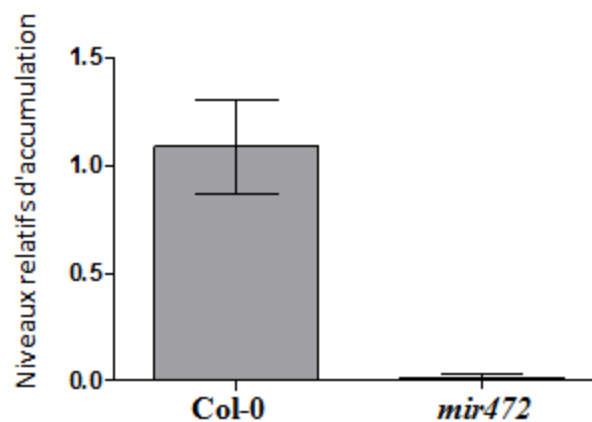


Figure annexée 1. Caractérisation du mutant déficient *miR472*.

a et b, Structure du gène *MIR472* (a) et son niveau d'accumulation chez le Col-0 (WT) *versus* la lignée d'insertion d'ADN-T (salk_087945C) (b). L'exon est représenté par une case noire. L'insertion d'ADN-T est indiquée par un triangle ouvert. Le site d'insertion a été vérifié par amplification de l'ADN génomique en utilisant les amorces décrites dans le tableau annexé 1. Les niveaux d'accumulation du *miR472* ont été quantifiés par qPCR (voir Matériel et Méthodes).

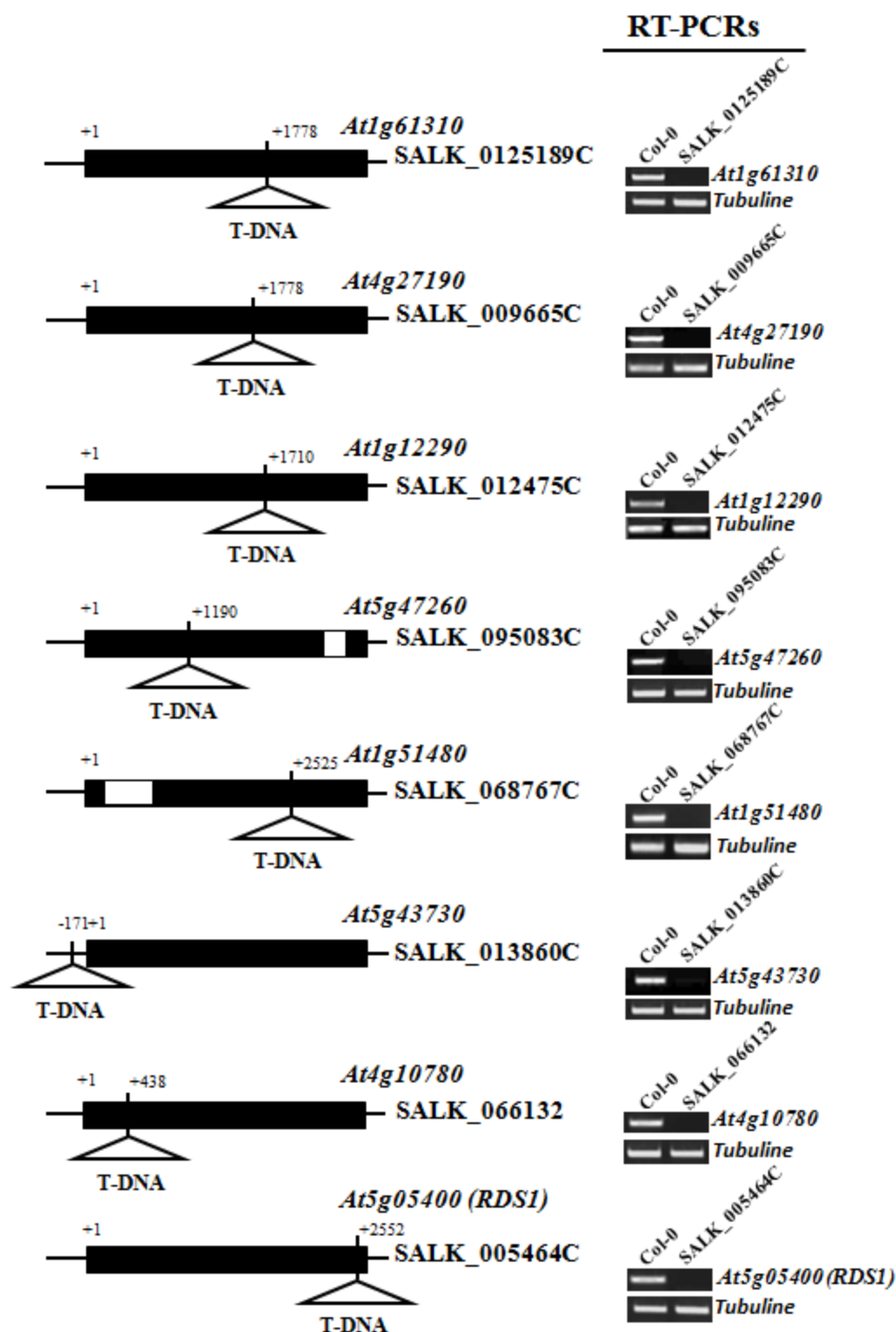


Figure annexée 2. Caractérisation des lignées d'insertion d'ADN-T utilisées dans cette étude.

Structures des gènes At5g43730, At5g47260, At5g05400, At4g27190, At4g10780, At1g61310, At1g51480 et At1g12290 (à gauche) et leurs niveaux d'expression chez le Col-0 (WT) *versus* les lignées d'insertion d'ADN-T (à droite). Les introns sont représentés par des cases blanches et les exons par des cases noires. Les insertions d'ADN-T chez At5g43730 (salk_013860C), At5g47260 (salk_095083C), At5g05400 (salk_005464C), At4g27190 (salk_009665C), At4g10780 (salk_066132), At1g61310 (salk_125189C), At1g51480 (salk_068767C) et At1g12290 (salk_012475C) sont indiquées par des triangles ouverts. Les sites d'insertion ont été vérifiés par amplification de l'ADN génomique en utilisant les amorces décrites dans le tableau annexé 1. Les niveaux d'accumulation de ces gènes ont été quantifiés par des RT-PCR semi-quantitatives. Le gène de la tubuline a été utilisé comme référence.

```

At1g12290 ...TCTACA-ACCAAC-GATTGTTGGTCAGGAAACAATTTTAGAAAAAGGCATGGGACCACCTC 510
At4g10780 ...TATTCA-ACCAAC-CATTATGGGTCGGGAAACAATTTTCAAAGGGCTTGGAAATCGTCTT 504
At1g12220 ...TTTTCA-ACCCAC-AATTGTTGGTCAGGAGATAATGCTTGAAAAGGCATGGAACCGCTC 589
At1g61310 ...TACTCA-GCCTAC-GA---TAGGTCAGGAAGAAATGCTCGAAAAGGCATGGAACCGCTT 507
At1g51480 ...TATCCATACCA-----CAGTTGGTTTGTATGCAATGGTTGAAATGGCATGGAAAAGCCTC 765
At5g43730 ...TATACAAACCA-----CAGTTGGTTTGGATACAATGGTTGGAATAGCATGGGAAAGCCTC 589
At5g05400 ...TTTCC--ACCAGGAGATAGTTGGTCAAGAGGCAATTGTTGAATCAACATGGAATAGTATG 510
          *  *  **          *  ***  *  ***  *  *  *  ***  *

                                CCAUACCCGCCUCAUCCUUUU
                                ||||| ||||| ||||| ||o|
At1g12290 ATGGATGATGGAACCTAAGATTATGGGTCTCTATGGCATGGGTGGAGTAGGAAAAACAACC 570
At4g10780 ATGGATGATGGAGTCGGAACCTATGGGTCTATATGGTATGGGGGGAGTAGGCAAAACCACC 564
At1g12220 ATGGAAGATGGATCOGGGATTTTGGGTCTGTACGGTATGGGGGGAGTAGGCAAAACGACA 649
At1g61310 ATGGAAGATGGAGTCGGAATCATGGGTCTGCACGGTATGGGTGGTGTAGGCAAAACAACC 567
At1g51480 ATGAATGATGAAATAAGAACCCTTGTGTCTTTCATGGTATGGGGGGAGTAGGAAAAACCACA 825
At5g43730 ATAGACGATGAAATAAGAACCCTTGGGTCTTTATGGTATGGGGGGAATAGGAAAAACCACC 649
At5g05400 ATGGAAGTGGGAGTTGGGCTTTTGGGTATATATGGTATGGGGGGAGTAGGCAAGACCACC 570
          ** * * * *          ** * * * * ** * * * * ** * * * * **

                                CTTCTCACTCAGATCAACAATAGGTTTTGTGACACCGATGATGGCGTTGAAATTGTCATT 630
At1g12290 CTTCTCAGCGAGATTCACAATACGTTACATGATACAAAGAATGGGGTTGACATTGTGATT 624
At4g10780 CTACTCAGGAAGATCAACAATAAGTTTTCTAAAATAGATGACAGATTTGATGTTGTGATA 709
At1g12220 CTTTTCAAGAAAAATCCACAACAAGTTTCGCTGAAATAGGTGGTACGTTTGACATTGTGATC 627
At1g61310 CTCTTAGCTTGCATCAACAACAATTCGTTGAACTGGAGAGTGAATTTGATGTTGTGATA 885
At1g51480 CTCTAGAAAGTCTCAACAACAATTTGTTGAACTGGAGAGTGAATTTGATGTAGTGATA 709
At5g43730 CTCTCTCTCAAATCAACAACAAGTTCCGCACAGTAAGCAACGATTTTGACATTGCAATA 630
At5g05400          ** *          *  * * * * *  **          * * * * *  * * * *

                                TGGGTTGTGGTATCTGGTGATCTACAAAT-CCACAAGATACAAAAAGAGATTGGCGAAA... 688
At1g12290 TGGGTTGTGGTGTCTAGTGATCTACAAAT-CCACAAGATTCAAGAAGATATTGGCGAAA... 682
At4g10780 TGGGTTGTGGTGTCTAGAGTTCAACAGT-CCGTAAGATACAAAGAGACATAGCAGAAA... 767
At1g12220 TGGATCGTGGTGTCTCAAGGCGCAAGCT-TTCAAAGCTTCAAGAAGATATTGCAGAGA... 685
At1g61310 TGGGTTGTGGTATCTAAAGACTTTAGCT-TGAGGGTATTCAAGATCAGATTCTTGGTA... 943
At1g51480 TGGGTTGTGGTATCTAAAGACTTTAGCT-TGAGGGGATTCAAGATCAGATTCTGGGGA... 767
At5g43730 TGGGTTGTAGTGTCTAAAAACC-CAACTGTTAAGAGGATTCAAGAAGACATTGGAAAA... 688
At5g05400          *** * * * * *          *          *  * * *  *  * *  *

```

Figure annexée 3. Alignement des cibles prédites et confirmées du miR472.

Alignement des séquences de gènes entourant le site ciblé par le miR472 (en gris) de *RDSI* (At5g05400, en gras) et des gènes étroitement liés, dont certains sont confirmés et d'autres sont des cibles prédites du miR472.

BIBLIOGRAPHIE

- Abd El Rahman, T., El Oirdi, M., Gonzalez-Lamothe, R., and Bouarab, K. (2012). Necrotrophic pathogens use the salicylic acid signaling pathway to promote disease development in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25, 1584–93.
- Abe, H. (2002). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell Online* 15, 63–78.
- Abramovitch, R.B., Janjusevic, R., Stebbins, C.E. and Martin, G.B. (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc. Natl Acad. Sci.* 103, 2851–2856.
- Adermann, K. (2006). Defensins as anti-infective and immunomodulatory agents. *Exp. Opin. Ther. Patents* 16, 1223–1234.
- Agrios, G.N. (1997). “Plant Pathology” 4th ed. (San Diego Academic Press).
- Agrios, G.N. (2005). “Plant pathology” 5th ed. (Boston: Elsevier Academic Press).
- Alfano, J.R., and Collmer, A. (1997). “The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death.” *J. Bacteriol.* 179, 5655–5662.
- Allen, R.S., Li, J.Y., Stahle, M.I., Dubroue, A., Gubler, F., and Millar, A.A. (2007). Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the *Arabidopsis* miR159 family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 16371–16376.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653–657.
- Ameres, S.L., and Zamore, P.D. (2013). “Diversifying microRNA sequence and function.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 475–488.
- Anderson, J.P., Badruzsaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., and Kazan, K. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate–ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 16, 3460–3479.
- Arenas-Huertero, C., Pérez, B., Rabanal, F., Blanco-Melo, D., De la Rosa, C., et al. (2009). Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Mol Biol.* 70(4), 385–401.

- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boiler, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* *415*, 977–983.
- Ashida, A., Ogawa M., Kim M., Mimuro H., and Sasakawa C. (2012). “Bacteria and host interaction on the out epithelial barrier.” *Nature Chemical Biology* *8*, 36–45.
- Aukerman, M.J., and Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* *15*, 2730–2741.
- Bari, R., and Jones, J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* *69*, 473–488.
- Bartel, D.P. (2004). “MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function”, *Cell* *116*, 281–297.
- Baskerville, S., and Bartel D.P. (2005). “Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes”, *RNA* *11*, 241–47.
- Bassil, K.L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D.C., Kaur, J.S., and Kerr, K.J. (2007). Cancer health effects of pesticides: Systematic review. *Can. Fam. Physician* *53*, 1704–1711.
- Baumberger, N., and Baulcombe D.C. (2005). “*Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs.” *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* *102*, 11928–11933.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., and Dangl, J.L. (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant Biol.* *7*, 391–399.
- Benedetti, C.E., and Arruda, P. (2002). “Altering the expression of the chlorophyllase gene *ATHCOR1* in transgenic *Arabidopsis* caused changes in the chlorophyll-to-chlorophyllide ratio.” *Plant Physiol.* *128*, 1255–1263.
- Berrie, A. (1994). The importance of *Botrytis cinerea* as a storage rot of apple cv. Cox and pear cv. Conference. *Norweg. J. Agric. Sci.* *17*, 383–389.
- Berto, P., Commenil, P., Belingheri, L., and Dehorter, B. (1999). Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *FEMS Microbiol.Lett.* *180*, 183–189.
- Boccaro, M., Sarazin, A., Thiébeauld, O., Jay, F., Voinnet, O., Navarro, L., and Colot, V. (2014). The *Arabidopsis* miR472-RDR6 silencing pathway modulates PAMP- and effector-triggered immunity through the post-transcriptional control of disease resistance genes. *PLoS Pathog.* *10*(1), e1003883.
- Boiler, T., and Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Ann. Rev. of Plant Biol.* *60*, 379–406.

- Boiler, T., and He, S.Y. (2009). Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science* 324, 742–744.
- Bollman, K.M., Aukerman, M.J., Park, M.Y., Hunter, C., Berardini, T.Z., and Poethig, R.S. (2003). “HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis.” *Development* 130, 1493–1504.
- Bologna, N.G., Mateos, J.L., Bresso, E.G., and Palatnik, J.F. (2009). A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *EMBO J.* 28(23), 3646–56.
- Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M., and Speed, T.P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19, 185–193.
- Bonardi, V., Tang, S., Stallmann, A., Roberts, M., Cherkis, K., and Dangl, J.L. (2011). Expanded functions for a family of plant intracellular immune receptors beyond specific recognition of pathogen effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 16463–8.
- Bostock, R.M. (2005). Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 545–580.
- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A., and Prat, S. (2004). Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. *Genes Dev.* 18, 1577–1591.
- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F.C., and Cammue, B.P.A. (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 393–416.
- Brooks, D.M., Bender, C.L., and Kunkel, B.N. (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant Pathol.* 6, 629–639.
- Browse, J. (2005). Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants. *Plant Hormones* 72, 431–456.
- Browse, J. (2009). Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Ann. Rev. of Plant Biol.* 60, 183–205.
- Buell, C.R., Joardav, V., and Lindeberg, M. (2003). “The complete sequence of the Arabidopsis and Tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 10181–10186.
- Burgyan, J., and Havelda, Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* 16, 265–272.

- Büttner, D., and Bonas, U. (2002). "Getting across bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell." *EMBO Journal* 21, 5313–5322.
- Chan, Y.L., Prasad, V., Sanjaya, Chen, K.h., Liu, P.C., Chan, M.T. and Cheng, C.P. (2005). Transgenic tomato plants expressing an Arabidopsis thionin (thi2.1) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack. *Planta* 221, 386–393.
- Chang, J.H., Urbach, J.M., Law, T.F., Arnold, L.W., Hu, A., Gombar, S., Grant, S.R., Ausubel, F.M., and Dangl, J.L. (2005). "A high-throughput, near-saturating screen of type III effector genes from *Pseudomonas syringae*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 2549–2554.
- Chapman, E.J., and Carrington J.C. (2007). "Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways". *Nat.Rev.Genet.* 8, 884–896.
- Charkowski, A., Alfano J.R., Preston G.M., Yuan J., He S.Y., and Collmer A. (1998). "The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind pectate." *J. Bacteriol.* 180, 5211–5217.
- Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., et al. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33, e179.
- Chen X. (2004). "A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development." *Science* 303, 2022–2025.
- Chen, X. (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 21–44.
- Chico, J.M., Chini, A., Fonseca, S., and Solano, R. (2008). JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 486–494.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803–814.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.M., Simon, A., and Viaud, M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters* 277, 1–10.
- Chuck, G., Candela, H., and Hake, S. (2009). Big impacts by small RNAs in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 81–86.
- Clary, T., and Ritz, B. (2003). Pancreatic cancer mortality and organochlorine pesticide exposure in California, 1989-1996. *Am. J. Ind. Med.* 43, 306–313.

- Collier, S.M., Hamel, L.P., and Moffett, P. (2011). Cell death mediated by the N-terminal domains of a unique and highly conserved class of NB-LRR protein. *Mol Plant Microbe Interact.* *24*, 918–31.
- Collmer, A., Badel, J.L., Charkowski, A.O., Deng, W.L., Fouts, D.E., Ramos, A.R., Rehm, A.H., Anderson, D.M., Schneewind, O., van Dijck, K., and Alfano R. (2000). “*Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 8770–8777.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J., and Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* *7*, 210–216.
- Cui, J., Bahrami, A.K., Pringle, E.G., Hernandez-Guzman, G., Bender, C.L., Pierce, N.E., and Ausubel, F.M. (2005). *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, *102*, 1791–1796.
- Cunnac, S., Lindberg, M., and Collmer, A. (2009). “*Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions.” *Current Opinion in Microbiology* *12*, 53–60.
- Cuperus, J.T., Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., and Burke, R.T. (2010). “Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis.” *Nat Struct Mol Biol* *17*, 997–1003.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* *411*, 826–833.
- Dai, X., and Zhao, P.X. (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Res.* *39*, 155–159.
- Delker, C., Stenzel, L., Hause, B., Miersch, O., Feussner, I., and Wasternack, C. (2006). Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*—enzymes, products, regulation. *Plant Biol.* *8*, 297–306.
- Devoto, A., and Turner, J.G. (2003). Regulation of jasmonate-mediated plant responses in Arabidopsis. *Ann. Bot.* *92*, 329–337.
- De Wit, P.J.G.M. (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci.* *2*, 452–458.
- Dhawan, R., Luo, H., Foerster, A.M., Abuqamar, S., Du, H.N., Briggs, S.D., Mittelsten Scheid, O., and Mengiste, T. (2009). HISTONE MONOUBIQUITINATION1 interacts with a subunit of the mediator complex and regulates defense against necrotrophic fungal pathogens in Arabidopsis. *Plant Cell* *21*, 1000–1019.
- Ding, S. W., and Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* *130*, 413–426.

- Doherty, H.M., Selvendran, R.R., and Bowles, D.J. (1988). The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **33**, 377–384.
- Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M., et al. (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **19**, 2225–2245.
- Dreher, K., and Callis, J. (2007). Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Annu. Bot.* **99**, 787–822.
- Dunoyer, P., Himber, C., and Voinnet, O. (2006) Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nat. Genet.* **38**(2), 258–263.
- Eitas, TK, and Dangl, JL (2010). NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Curr Opin Plant Biol.* **13**, 472–477.
- Ellendorff, U., Fradin, E.F., de Jonge, R., and Thomma, B.P. (2009). RNA silencing is required for *Arabidopsis* defence against *Verticillium* wilt disease. *J Exp Bot.* **60**(2), 591–602.
- El Oirdi, M., Abd El Rahman, T., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M.C., et al. (2011). *Botrytis cinerea* Manipulates the Antagonistic Effects between Immune Pathways to Promote Disease Development in Tomato. *The Plant Cell* **23**, 2405–2421.
- El Oirdi, M., and Bouarab, K. (2007). Plant signalling components EDS1 and SGT1 enhance disease caused by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *New Phytol.* **175**, 131–9.
- El Oirdi, M., Trapani, A., and Bouarab, K. (2010). The nature of tobacco resistance against *Botrytis cinerea* depends on the infection structures of the pathogen. *Environ. Microbiol.* **12**, 239–253.
- Espinosa, A., Guo, M., Tam, V.C., Fu, Z.Q., and Alfano, J.R. (2003). The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Mol. Microbiol.* **49**, 377–387.
- Eitas, T.K., and Dangl, J.L. (2010). NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 472–477.
- Erb, M., Meldau, S., and Howe, G. A. (2012). Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends Plant Sci.* **17**, 250–259.
- Eulgem, T., and Somssich, I.E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 366–371.

- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D.G., Daniels, M.J., and Parker, J.E. (1999). EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis*, has homology to eukaryotic lipases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3292–3297.
- Farmer, E.E., (2007). Plant biology: jasmonate perception machines. *Nature* 448, 659–660.
- Farmer, E.E., Almeras, E., and Krishnamurthy, V. (2003). “Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory.” *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 372–378.
- Faulkner, C., and Robatzek, S. (2012). Plants and pathogens: Putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 699–707.
- Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M., and Nurnberger, T. (2002). NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant J.* 32, 375–390.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999). “Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin.” *Plant J.* 18, 265–276.
- Feys, B.J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., and Turner, J.G. (1994). “*Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen.” *Plant Cell* 6, 751–759.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Flor, H.H. (1971). “Current status of gene-to-gene concept.” *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275–296.
- Freeman, B.C., and Beattie, G.A. (2008). “An overview of plant defense against pathogens and herbivores.” *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B., Tian, F., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Staiger, D., and Alfano, J.R. (2007). A type III effector modifies RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature*, 447, 284–288.
- Fujii, H., Chiou, T.J., Lin, S.I., Aung, K., and Zhu, J.K. (2005). “A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*.” *Curr. Biol.* 15, 2038–2043.
- Gabriels, S.H., Vossen, J.H., Ekengren, S.K., van Ooijen, G., Abd-El-Halim, A.M., et al. (2007). An NB-LRR protein required for HR signalling mediated by both extra- and intracellular resistance proteins. *Plant J.* 50, 14–28.
- Galan, J.E., and Collmer, A. (1999). “Type III secretion machines: bacterial devices for delivery of proteins into host cells.” *Science* 284, 1322–1328.

- Gao, X., Gulari, E., and Zhou, X. (2004). In situ synthesis of oligonucleotide microarrays. *Biopolymers* 73, 579–596.
- Garcia, D. (2008). A miracle in plant development: Role of microRNAs in cell differentiation and patterning. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, 586–595.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., and Grimont, F. Grimont. (1999). “DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremiae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov.” [ex Sutic and Dowson 1959]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 469–78.
- Geng, X., Cheng, J., Gangadharan, A., and Mackeya, D. (2012). The Coronatine Toxin of *Pseudomonas syringae* Is a Multifunctional Suppressor of *Arabidopsis* Defense. *Plant Cell* 24(11), 4763–4774.
- Gilchrist, D.G. (1998). Programmed cell death in plant disease: The purpose and promise of cellular suicide. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 393–414.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Metraux, J.P., Zhu, T., and Katagiri, F. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.* 34, 217–228.
- Gohre, V., and Robatzek, S. (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 189–215.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T. (2002) “Flagellin perception: a paradigm for innate immunity.” *Trends Plant Sci.* 7, 251–256.
- Gonzalez-Lamothe, R., El Oirdi, M., Brisson, N., and Bouarab, K. (2012). The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *The Plant Cell* 24, 762–77.
- Grant, M., and Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 414–420.
- Greenberg, J.T., and Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Cell Microbiol.* 6, 201–211.
- Guest, D., and Brown, J. (1997). Infection processes. *Plant pathogens and plant diseases.* Armidale, 245–262.
- Hahlbrock, K., Bednarek, P., Ciolkowski, I., Hamberger, B., Heise, A., Liedgens, H., Logemann, E., Nurnberger, T., Schmelzer, E., Somssich, I. E., and Tan, J.W. (2003). Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 14569–14576.

- Hammer, P.E., Yang, S.F., Reid, M.S., and Marois, J. (1990). Postharvest control of *Botrytis cinerea* infections on cut roses using fungistatic storage atmospheres. *J. Americ. Soc. Hortic. Sci.* 115, 102–107.
- Hammerschmidt, R. (1999). Phytoalexins: What have we learned after 60 years. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 285–306.
- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, D.G. (1996). “Resistance gene-dependent plant defense responses.” *The Plant Cell* 8, 1773–1791.
- Hann, D.R., and Rathjen, J.P. (2007). “Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*.” *Plant* 49, 607–618.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D. (2000). “Bacteria on the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus and epiphyte”, *Microb. Mol. Biol. Rev.* 64, 624–653.
- Höck, J., and Meister, G. (2008). “The Argonaute protein family”, *Genome Biology* 9, 210.
- Hoyos, M.E., Stanley, C.M., He, S.Y., Pu, X., and Novacky, A. (1996). “The interaction of Harpin_{PSS} with plant cell wall.” *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 608–616.
- Howe, G. A., and Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 41–66.
- Hu, X.Y., Neill, S.J., Tang, Z.C., and Cai, W.M. (2005). Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol.* 137, 663–670.
- Huckelhoven, R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 101–127.
- Humpherson-Jones, F.M., and Phelps, K. (1989). Climatic factors influencing spore production in *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola*. *Ann. appl. Biol.* 114, 449–458.
- Jagadeeswaran, G., Zheng, Y., Li, Y.F., Shukla, L.I., Matts, J., et al. (2009). Cloning and characterization of small RNAs from *Medicago truncatula* reveals four novel legume-specific microRNA families. *New Phytol.* 184(1), 85–98.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review in Plant Biology* 57, 19–53.
- Katagiri, F. (2004). A global view of defense gene expression regulation-a highly interconnected signaling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 506–511.

Katagiri, F., Thilmony, R., and He, S.Y. (2002). The *Arabidopsis Thaliana*-*Pseudomonas Syringae* Interaction. The Arabidopsis Book, e0039.

Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Jr, Zhu, J.K., Staskawicz, B.J., and Jin, H. (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. *103*, 18002–18007.

Katiyar-Agarwal, S., Gao, S., Vivian-Smith, A., and Jin, H. (2007). A novel class of bacteria-induced small RNAs in Arabidopsis. Genes Dev. *21*, 3123–3134.

Kazan, K., and Manners, J. M. (2013). MYC2: the master in action. Mol. Plant *6*, 686–703.

Kettles, G.J., Drurey, C., Schoonbeek, H.J., Maule, A.J., and Hogenhout, S.A. (2013). Resistance of *Arabidopsis thaliana* to the green peach aphid, *Myzus persicae*, involves camalexin and is regulated by microRNAs. New Phytol *198*, 1178–1190.

Khraiwesh, B., Arif, M.A., Seumel, G.I., Ossowski, S., Weigel, D., Reski, R., and Frank, W. (2010). Transcriptional control of gene expression by microRNAs. Cell *140*, 111–122.

Kiraly, L., Barna, B., and Kiraly, Z. (2007). Plant resistance to pathogen infection: Forms and mechanisms of innate and acquired resistance. J. Phytopathol. *155*, 385–396.

Kohli, D., Joshi, G., Deokar, A.A., Bhardwaj, A.R., Agarwal, M., et al. (2014). Identification and Characterization of Wilt and Salt Stress-Responsive MicroRNAs in Chickpea through High-Throughput Sequencing. PLoS One *9*(10):e108851.

Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F.C., Van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J. (2008). Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. Plant Physiol. *147*, 1358–1368.

Kozomara, A., and Griffiths Jones, S. (2011). “miRBase integrating microRNAs annotation and deep sequencing data”, Nucleic Acid Research *39*, 152–157.

Kufer, T.A., and Sansonetti, P.J. (2011). NLR functions beyond pathogen recognition. Nature Immunology *12*, 121–8.

Kurihara, Y., Matsui, A., Hanada, K., Kawashima, M., Ishida, J., Morosawa, T., et al. (2009). Genome-wide suppression of aberrant mRNA-like noncoding RNAs by NMD in Arabidopsis. Proc. Natl Acad. Sci. *106*, 2453–2458.

La Camera, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffmann, L., Fritig, B., Legrand, M., and Heitz, T. (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. Immunol. Rev. *198*, 267–284.

Lai, Z., Schluttenhofer, C.M., Bhide, K., Shreve, J., Thimmapuram, J., Lee, S.Y., Yun, D.J., and Mengiste, T. (2013). MED18 interaction with distinct transcription factors regulates multiple plant functions. Nature Communications *5*, 3064.

Lamb, C., and Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.* 48, 251–275.

Laubinger, S., Zeller, G., Henz, S.R., Buechel, S., Sashsenberg, T., Wang, J.T., Ratsch, G., and Weigel, D. (2010). “Global effects of small RNA biogenesis machinery on the *Arabidopsis thaliana* transcriptome”. *PNAS Early Edition*.

Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I.H., and Kunkel, B.N. (2006). The *Arabidopsis thaliana* JASMONATE INSENSITIVE 1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 789–800.

Lebailly, P., Niez, E., and Baldi, I. (2007). Données épidémiologiques sur le lien entre cancers et pesticides. *Oncologie* 9, 361–369.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–54.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (2004). A short history of a short RNA. *Cell* 116, 89–92.

Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J., Cohn, M., Tung, J., Sun, H., Kumar, P., and Baker, B. (2012). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 1790–1795.

Li, H., Xu, H., Zhou, Y., Zhang, J., Long, C., Li, S., Chen, S., Zhou, J.M., and Shao, F. (2007). The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science* 315, 1000–1003.

Li, X., Lin, H., Zhang, W., Zou, Y., Zhanng, J., Tang, X., and Zhou J.M. (2005). «Flagellin induces innate immunity in non host interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors.” *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 102, 12990–12995.

Li, Y., Zhang, Q.Q., Zhang, J.G., Wu, L., Qi, Y.J., and Zhou, J.M. (2010). Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiol.* 152, 2222–2231.

Liechti, R., and Farmer, E.E. (2006). Jasmonate biochemical pathway. *Sci. STKE*.

Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M., and Dougherty, W.G. (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *The Plant Cell* 5, 1749–1759.

Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (2002). “Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA.” *Science* 297, 2053–2056.

Lorenzo, O., and Solano, R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 532–540.

- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2004). JASMONATE - INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 1938–1950.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J. J., and Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15, 165–178.
- Lu, C., Kulkarni, K., Souret, F.F., Muthuvalliappan, R., Tej, S.S., Poethig, R.S., Henderson, I.R., Jacobsen, S.E., Wang, W., Green, P.J., et al. (2006). MicroRNAs and other small RNAs enriched in the *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase-2 mutant. *Genome Res.* 16, 1276–1288.
- Macagnan, D., Chaves, Z. M., and Cafe-filho, A. C. (2010). First report of *Alternaria brassicicola* on *Crambe abyssinica* in Goiás state, Brazil. *Summa phytopathol.* 36, 260–260.
- Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006). “Structural basis for double stranded RNA processing by Dicer.” *Sciences* 311, 195–198.
- Mallory, A.C., Dugas, D.V., Bartel, D.P., and Bartel, B. (2004). “MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative and floral organs.” *Curr.Biol.* 14, 1035–1046.
- Melnyk, C.W., Molnar, A., and Baulcombe, D.C. (2011). Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.* 30, 3553–63.
- Melotto, M., Underwood, W., and He S.Y. (2008). “Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases.” *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 101–122.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and HE, S.Y. (2006). “Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion.” *Cell* 126, 969–980.
- Memelink, J. (2009). Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* 70, 1560–1570.
- Mendgen, K., Hahn, M., and Deising, H. (1996). Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 34, 367–386.
- Mengiste, T. (2012). Plant immunity to necrotrophs. *Annu Rev Phytopathol* 50, 267–294.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., and Michelmore, R.W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 15, 809–834.
- Mishra, N.S., Tuteja, R., and Tuteja, N. (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch Biochem Biophys* 452, 55–68.

- Mittal, S., and Davis, K.R. (1995). Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8, 165–171.
- Mitchell, R.E. (1982). “Coronatine production by some phytopathogenic pseudomonads.” *Physiol. Plant Pathol.* 20, 8389.
- Moffett, P. (2009). Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. *Adv. Virus Res.* 75, 1–33.
- Moreno-Risueno, M.A., Van Norman, J.M., and Benfey, P.N. (2012). Transcriptional switches direct plant organ formation and patterning. *Curr. Top. Dev. Biol.* 98, 229–257.
- Moriyama, K., Hayashida, K., Shimada, M., Nakano, S., Nakashima, Y., and Fukumaki, Y. (2003). Antisense RNAs transcribed from the upstream region of the precore/core promoter of hepatitis B virus. *J Gen Virol.* 84, 1907–13.
- Morohashi, Y., and Matsushima, H. (2000). Development of β -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. *J. Exp. Bot.* 51, 1381–1387.
- Morrissey, J.P., and Osbourn, A.E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63, 708–724.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., and Wasternack, C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* 140, 249–262.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* 2, 279–289.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., and Jones, J.D. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312, 436–9.
- Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S.Y., and Voinnet, O. (2008). Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 321, 964–967.
- Nickstadt, A. Homma, B.P.H.J., Feussner, I., Kangasjärvi, J., et al. (2004). The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 5, 425–434.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B.F., and Dangl, J.L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Ann. Rev. Genet.* 37, 579–609.

- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L. (2004). "Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences." *Immunol. Rev.* 198, 249–266.
- Osbourn, A.E. (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant defense against Fungal Attack. *Plant Cell* 8, 1821–1831.
- Ouyang, S., Park, G., Atamian, H.S., Han, C.S., Stajich, J.E., et al. (2014). MicroRNAs suppress NB domain genes in tomato that confer resistance to *Fusarium oxysporum*. *PLoS Pathogens* 10(10):e1004464.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C., and Weigel, D. (2003). "Control of leaf morphogenesis by microRNAs." *Nature* 425, 257–263.
- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., and Feyereisen, R. (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J.* 31, 1–12.
- Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2006). Molecular mechanism of target RNA transcript recognition by Argonaute-guide complexes *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 45–50.
- Peart, J.R., Cook, G., Feys, B.J., Parker, J.E., and Baulcombe, D.C. (2002). An *EDS1* orthologue is required for *N*-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant J.* 29, 569–579.
- Peart, J.R., Mestre, P., Lu, R., Malcuit, I., and Baulcombe, D.C. (2005). NRG1, a CC-NB-LRR protein, together with N, a TIR-NB-LRR protein, mediates resistance against tobacco mosaic virus. *Curr. Biol.* 15, 968–973.
- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Métraux, J.P., and Broekaert, W.F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 2103–2113.
- Phillips, J.R., Dalmay, T., and Bartels, D. (2007). The role of small RNAs in abiotic stress. *FEBS Lett.* 581, 3592–3597.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and VanWees, S.C.M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308–16.
- Pieterse, C. M., Van Der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 489–521.
- Pitzschke, A., Schikora, A., and Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 421–426.

Poethig, R.S. (2009). Small RNAs and developmental timing in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *19*, 374–378.

Poueymiro, M. (2009). “Caractérisation fonctionnelle des effecteurs de type III de *Ralstonia solanacearum* : AvrA et PopPA, délimitant le spectre d’hôte et RipTPS synthétisant une molécule signal chez les plantes. ” Université de Toulouse III Paul Sabatier.

Preston, G.M. (2000). “*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen of the right plant, at the right time.” *Molecular Plant Pathology* *1*, 263–275.

Preston, G.M., Huang, H.C., He, S.Y., and Collmer, A. (1995). “The HrpZ proteins of *Pseudomonas syringae* pvs. *syringae*, *glycinae* and *tomato* are encoded by an operon containing Yersinia ysc homologs and elicit the hypersensitive response in tomato but not in soybean.” *Mol. Plant-Microbe Interact.* *8*, 717–732.

Pruss, G.J., Nester, E.W., and Vance, V. (2008). Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* induces host defense and development-dependent responses in the infiltrated zone *Mol. Plant Microbe Interact.* *21*, 1528–1538.

Pumplin, N., and Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*, *11*, 745–760.

Qi, Y., Tsuda, K., Glazebrook, J., and Katagiri, F (2011). Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in *Arabidopsis*. *Mol Plant Pathol.* *12*, 702–708.

Qiao, Y., Liu, L., Xiong, Q., Flores, C., Wong, J., Shi, J., Wang, X., Liu, X., Xiang, Q., Jiang, S., Zhang, F., Wang, Y., Judelson, H.S., Chen, X., and Ma, W. (2013). Oomycete Pathogens Encode RNA Silencing Suppressors. *Nature Genetics* *45*, 330–333.

Qu, F., Ye, X., and Morris, T.J. (2008). *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 14732–14737.

Ratcliff, F., Harrison, B.D., and Baulcombe, D.C. (1999). Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *The Plant cell* *11*, 1207–1216.

Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* *16*, 1616–1626.

Ribeiro, J.M., Pereira, C.S., Soares, N.C., Vieira, A.M., Feijó, J.A., and Jackson, P.A. (2006). The contribution of extensin network formation to rapid, hydrogen peroxide-mediated increases in grapevine callus wall resistance to fungal lytic enzymes. *J. Exp. Bot.* *57*, 2025–2035.

Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., and Jones, J.D. (2007). Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol.* *10*, 372–379.

Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, E.L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M., and He S.Y. (1997). “HrpA, a structural protein of a novel bacterial pilus required for plant-bacterial interaction.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 3459–3464.

Ronemus, M., Vaughn, M.W., and Martienssen, R.A. (2006). MicroRNA-targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by Argonaute, Dicer, and RNA-dependent RNA Polymerase in Arabidopsis. *Plant Cell* *18*, 1559–1574.

Ruiz, M.T., Voinnet, O., and Baulcombe, D.C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant Cell* *10*, 937–946.

Ruiz-Ferrer, V., and Voinnet, O. (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu Rev Plant Biol.* *60*, 485–510.

Sachetto-Martins, G., Franco, L.O., and De Oliveira, D.E. (2000). Plant glycin-rich proteins: A family of just proteins with a common motif. *Biochim. Biophys. Acta.* *1492*, 1–14.

Samuel, M.A., Hall, H., Krzymowska, M., Drzewiecka, K., Hennig, J., and Ellis, B.E. (2005). SIPK signaling controls multiple components of harpin-induced cell death in tobacco. *Plant J.* *42*, 406–416.

Sansregret, R., Dufour, V., and Bouarab, K. (2008). Small interfering RNAs are required for the recognition of a plant immune elicitor. Canadian Society of Phytopathology, June 15-18, Charlottetown, IPE, Canada.

Savatin, D.V., Ferrari, S., Sicilia, F., and De Lorenzo, G. (2011). Oligogalacturonide-auxin antagonism does not require posttranscriptional gene silencing or stabilization of auxin response repressors in Arabidopsis. *Plant Physiol* *157*, 1163–1174.

Schaller, A., and Stintzi, A. (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - structure, function, regulation. *Phytochemistry* *70*, 1532–1538.

Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W., and Ray, A. (2002). “DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development.” *Trends Plant Sci.* *7*, 487–491.

Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., and Weigel, D. (2005). “Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome.” *Dev. Cell.* *8*, 517–527.

Seo, G.J., Kincaid, R.P., Phanaksri, T., Burke, J.M., Pare, J.M., Cox, J.E., Hsiang, T.-Y., Krug, R.M., and Sullivan, C.S. (2013). Intracellular antiviral signaling mediates inhibition of RNAi in mammalian cells. *Cell Host Microbe* *14*, 435–445.

Settimi, L., Masina, A., Andron, A., and Axelson, O. (2003). Prostate cancer and exposure to pesticides in agricultural settings. *Int. J. Cancer* *104*, 458–461.

- Shiboleth, Y.M., Haronsky, E., Leibman, D., Arazi, T., Wassenegger, M., Whitham, S.A., Gaba, V., and Gal-On, A. (2007). The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *J. Virol.* *81*, 13135–13148.
- Shi, R., and Chiang, V.L. (2005). Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques* *39*, 519–525.
- Shivaprasad, P.V., Chen, H.M., Patel, K., Bond, D.M., Santos, B.A.C.M., and Baulcombe, D. C. (2012). A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *The Plant Cell* *24*, 859–74.
- Smith, I.M., Dunez, J., Phillips, D.H., Lelliott, R.A., and Archer, S.A. (1988). *European Handbook of Plant Diseases*. Blackwell Sci. Pub., Oxford, London.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). “Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity.” *Science* *305*, 1434–1437.
- Souret, F.F., Kastenmayer, J.P., and Green, P.J. (2004). “AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrate include selected miRNA target.” *Molecular Cell*, *15*, 173–183.
- Spoel, S.H., Johnson, J.S., and Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 18842–18847.
- Staal, J., Kaliff, M., Dewaele, E., Persson, M., and Dixelius, C. (2008). RLM3, a TIR domain encoding gene involved in broad-range immunity of Arabidopsis to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal* *55*, 188–200.
- Stintzi, A., and Browse, J. (2000). The Arabidopsis male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 10625–10630.
- Stout, M.J., Thaler, J.S., and Thomma, B.P.H.J. (2006). Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* *51*, 663–689.
- Takeda, A., Tsukuda, M., Mizumoto, H., Okamoto, K., kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. (2005). A pant RNA virus suppressor RNA silencing throughRNA replication. *Europ. Mol. Biological Organ J.* *24*, 3147–3157.
- Takken, F.L., Albrecht, M., and Tameling, W.I. (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* *9*, 383–390.
- Takken, F.L.W., and Tameling, W.I.L. (2009). To Nibble at Plant Resistance Proteins. *Science* *324*, 744–746.

- Tampakaki, A.P., Skandalis, N., Gazi, A.D., Bastaki, M.N., Sarris, P.F., Charova, S.N., Kakkinidis, M.N., and Panopoulos, N.J. (2010). "Playing the "Harp": evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes." *Annual Review of Phytopathology* 48, 347–370.
- Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Ind. Biotechno.* 2, 194–208.
- Thatcher, L.F., Manners, J.M., and Kazan, K. (2009). *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 58, 927–39.
- Thevissen, K., Terras, F.R., and Broekaert, W.F. (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5451–5458.
- Thomma, B.P.H.J., Penninckx, I.A.M.A., Broekaert, W.F., and Cammue, B.P.A. (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 63–68.
- Truman, W., Bennett, M.H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C., and Grant, M. (2007). *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 1075–1080.
- Underwood, W., Melotto, M., and He, S.Y. (2007). Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell Microbiology* 9, 1621–1629.
- Valkonen, J.P.T., and Koponen, H. (1990). The seed-borne fungi of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*), their pathogenicity and control. *Plant Pathology* 39, 510–516.
- Van der Krol, A.R., Mur, L.A. Beld, M. Mol, J.N.M., and Stuitje, A.R. (1990). Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291–299.
- Van Kan, J.A.L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 11, 247–253.
- Van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162.
- Van Wees, S.C.M., De Swart, E.A.M., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J. (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8711–8716.
- Varallyay, E., Valoczi, A., Agyi, A., Burgyan, J., and Havelda, Z. (2010). Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO J.* 29, 3507–3519.

Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P., and Bartel, D.P. (2004). "The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development." *Genes Dev.* *18*, 1187–1197.

Verhoeff, K. (1980). The infection process and host-pathogen interactions. *The Biology of Botrytis*. J.R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W.R. Jarvis, eds. Academic Press London 153–180.

Voegele, R.T., Hahn, M., and Mendgen, K. (2009). The Uredinales: Cytology, Biochemistry, and molecular biology. In *Plant Relationships* *2*, 69–98.

Voinnet, O. (2009). "Origin, biogenesis and activity of plant microRNAs", *Cell* *136*, 669–687.

Wallis, J.G., and Browse, J. (2002). Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. *Prog. Lipid Res.* *41*, 254–278.

Walton, J.D. (1994). Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* *104*, 1113–1118.

Wang, J.W., Wag, L.J., Mao, Y.B., Cai, W.J., Xue, H.W., and Chen, X.Y. (2005). "Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*." *Plan Cell* *17*, 2204–2216.

Wang, X. B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W.X., Chen, X., Yu, J.L., and Ding, S.W. (2010). RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 484–489.

Wang, X. J., Reyes, J.L., Chua, N.H., and Gaasterland, T. (2004). "Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets." *Genome Biol.* *5*, 65.

Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* *100*, 681–697.

Waterhouse, P.M., Wang, M.B., and Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* *411*, 834–842.

Weiberg, A., Wang, M., Lin, F., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H., and Jin, H. (2013). Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. *Science* *342*, 118–123.

Weber, H. (2002). Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.* *7*, 217–224.

Weir, B. S. (2013). "Pathogens don't carry passport: Taxonomic aspects of the Psa story." Landcare Research Link Seminar 28 May 2013.

Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinsons, S.P., Gleave, A.P., Green,

- A.G., and Waterhouse, P.M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* 27, 581–590.
- Wiermer, M., Feys, B.J., and Parker, J.E. (2005). Plant immunity: The EDS1 regulatory node. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 383–389.
- Woodward, F.I. (1987). “Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ concentration from the preindustrial levels”. *Nature* 327, 617–18.
- Wu, Q., Luo, Y., Lu, R., Lau, N., Lai, E.C., Li, W.X., and Ding, S.W. (2010). Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. *Proc. Natl Acad. Sci.* 107, 1606–1611.
- Yamaguchi, Y., and Huffaker, A. (2011). “Endogenous peptide elicitors in higher plants.” *Current Opinion in Plant Biology* 4, 351–357.
- Yang, D.L., Yao, J., Mei, C.S., Tong, X.H., Zeng, L.J., Li, Q., Xiao, L.T., Sun, T., Li, J., Deng, X.W., et al (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1192–E1200.
- Yi, H., and Richards, E.J. (2007). A cluster of disease resistance genes in *Arabidopsis* is coordinately regulated by transcriptional activation and RNA silencing. *Plant Cell* 19, 2929–2939.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., and Chen, X. (2005). “Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis.” *Science* 307, 932–935.
- Zeng, W., and He, H.Y. (2010). A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 153, 1188–98.
- Zhai, J., Jeong, D.H., De Paoli, E., Park, S., Rosen, B.D., et al. (2011). MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes Dev* 25, 2540–2553.
- Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M.S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T.L., Barchetti, A., Ward, M.R., Yao, G., Medina, A., O'brien-Jenkins, A., Katsaros, D., Hatzigeorgiou, A., Gimotty, P.A., Weber, B.L., and Coukos, G. (2006). MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 9136–9141.
- Zhang, B., Pan, X., and Stellwag, E.J. (2008). “Identification of soybean microRNAs and their targets”, *Planta* 229, 161–182.

Zhang, X, Zhao, H., Gao, S., Wang, W.C., Katiyar-Agarwal, S, Huang, H.D., Raikhel, N, and Jin, H. (2011). Arabidopsis Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393*-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12. *Mol Cell* 42, 356–66.

Zhenhai, Z., Jingyin, Y., Daofeng, L., Zuyong, Z., Fengxia, L., Xin, Z., Tao, W., Yi, L., and Zhen, S. (2010). PMRD: plant microRNA database. *Nucleic Acids Research* 38, 806–813.

Zhu, Q., Hong, A., Sheng, N., Zhang, X., Matejko, A., et al. (2007). microParaflo biochip for nucleic acid and protein analysis. *Methods Mol Biol* 382, 287–312.

Zipfel, C., and Felix, G. (2005). “Plants and animals: a different taste for microbes?” *Curr. Opin. Plant. Biol.* 8, 353–360.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31(13), 3406–3415.

